

From the Department of Zoology, Columbia University, New York

POLYPLOIDY AND FRAGMENTATION IN THE
CHROMOSOMAL EVOLUTION OF
VARIOUS SPECIES OF THYANTA (HEMIPTERA)

By

FRANZ SCHRADER and SALLY HUGHES-SCHRADER

With 45 figures in the text

(Eingegangen am 10. August 1955)

Contents

	Page
I. Introduction	469
II. Material and Methods	470
Systematics and Distribution	470
Methods	471
III. Cytology	473
1. <i>T. perditior</i>	473
2. <i>T. pseudocasta</i>	474
3. <i>T. antiguensis</i>	474
4. <i>T. pallidovirens</i>	475
5. <i>T. custator</i>	476
6. <i>T. calceata</i>	477
7. Hybrid: <i>T. custator</i> ♀ × <i>T. pallidovirens</i> ♂	478
8. Hybrid: <i>T. calceata</i> ♀ × <i>T. pallidovirens</i> ♂	479
IV. Cytophotometry of DNA	484
1. DNA in <i>Thyanta</i>	484
2. DNA in Hybrids	485
3. DNA in <i>Arvelius</i>	487
V. Discussion	487
1. Polyploidy	488
2. Fragmentation	490
3. DNA and Chromosome Structure	493
Summary	495
References	495

I. Introduction

A consideration of the evolutionary relationships among the *Hemiptera* must, of necessity, take into account the different chromosome numbers that characterize various species. But such a consideration must also reckon with the fact that all hemipteran chromosomes seem to have a diffuse kinetochore, a feature that may underlie a departure from the type of chromosomal changes that are involved in the evolution of organisms with a localized kinetochore.

Indeed it was in the *Hemiptera* that an unusual variation in chromosome number within the species first obtruded itself on the zoological

systematist, for it was in his study of the pentatomid *Thyanta custator* that WILSON (1911) encountered individuals that carried 27 and 28 chromosomes (in the male and female respectively) whereas the number of chromosomes in the majority of his specimen was 16 (in both sexes). It was this cytological finding that induced BARBER (1911) to reexamine the taxonomic status of *Thyanta custator* and to conclude that WILSON's specimen with the higher chromosome number were to be identified as *Thyanta calceata*, a species first described by SAY in 1832 but later considered as synonymous with *Thyanta custator* (see, among others, KIRKALDY, 1909). BARBER pointed out several structural differences between the two forms which, though not striking, were nonetheless constant and justified the resurrection of *Thyanta calceata* as a valid species even without the cytological evidence.

In the following pages the questions, arising from these findings, are reexamined and a somewhat broader survey of the genus *Thyanta* is utilized in the study. It will be seen that it is not only *Thyanta calceata* that is exceptional in its chromosome complement but that the same is true of *Thyanta custator* and *Thyanta pallidovirens*, the only other two species of *Thyanta* that have a distribution in temperate North America, east of the Mississippi River. In contrast, all of the tropical species of the genus that we have examined conform closely to what may be considered typical in chromosome complement and chromosome behavior in the Family *Pentatomidae*.

II. Material and Methods

1. Systematics and Distribution

A review and revision of the systematic aspects of the species included in the genus *Thyanta* beyond that given by JENSEN-HAARUP (1928) is now badly needed. The task is being undertaken by Professor H. RUCKES at the American Museum of Natural History and he has helped us considerably in the consideration of taxonomic questions that have arisen in the course of our work.

In brief, it may be stated here that not only was *T. calceata* unjustifiably relegated to synonymy with *T. custator*, but that a similar invalidation of *T. pallidovirens*, first described by STAL in 1859, is now found by RUCKES and SAILER (1956) to be also unjustified. The confusion caused by the proceedings of earlier taxonomists is compounded by the fact that the species considered to be *T. custator* by the great majority of previous authors is really the *T. pallidovirens* of STAL; the true *T. custator* of FABRICIUS is confined to a rather narrow strip along the Atlantic Coast. It may be stated here that all three of these species are superficially rather similar and that, for a trustworthy identification, an examination under a binocular is advisable.

Of the three, *T. pallidovirens* is by far the most "successful" species and, according to RUCKES and SAILER, has evolved four races which occur in a more or less serial order from the Atlantic to the Pacific Coast of the United States, with some extensions into Canada and Mexico.

T. calceata also has a rather extensive range east of the Mississippi River and in many of the regions it is sympatric with *T. pallidovirens*. Thus on some occasions we have collected both of the species from the same fields in Maryland and North Carolina. But in our experience, *T. calceata* is never as common as *T. pallidovirens* and, in fact, has disappeared or become rare in some of the regions where it was formerly rather common. For instance, in the three summers of 1951, 1952 and 1953, intensive collecting over a rather large area near Madison, New Jersey (where Professor E. B. WILSON in 1905 and 1906 collected a considerable number) did not produce a single *T. calceata*; and in certain regions in Maryland, west of Washington, D.C., from which it has been recorded in the past, only three specimens were caught in 1953. In this latter region Dr. R. I. SAILER has had similar experiences. Again in western Virginia and North Carolina, *T. calceata* was found only sporadically and in small numbers whereas *T. pallidovirens* was often quite common. In short, on such evidence it appears that *T. calceata* is at present not a "successful" species.

Whereas the three species just discussed are inhabitants of temperate North America, the other three species investigated by us are primarily tropical in habitat, though they may reach the subtropical or southern fringes of the United States. *T. antiguensis* and *T. pseudocasta* are inhabitants of the West Indies and Central America, but *T. perditor* has the most extended range of all Thyantas. It has been recorded from the southern edge of the United States through Central and most of tropical South America, as far south as Uruguay.

2. Methods

The species, and the regions where they were collected by us, may be given as follows:

- T. custator* FABRICIUS: Florida, Maryland,
- T. pallidovirens* STAL: North Carolina, Virginia, Maryland,
- T. calceata* SAY: North Carolina, Maryland,
- T. perditor* FABRICIUS: Southern Florida, Trinidad,
- T. pseudocasta* BLATCHLEY: Florida (Matcombe Key), Trinidad,
- T. antiguensis* WESTWOOD: Haiti.

All of these species except *T. antiguensis* and *T. pseudocasta* have been bred in the laboratory. Dr. R. I. SAILER of the Entomology Research Branch, U. S. Department of Agriculture has, in the course of his extensive hybridization experiments, evolved very successful breeding

methods for pentatomids. We owe to him not only unpublished data concerning his attempts to hybridize several species of *Thyanta*, but also the valuable hybrid material used in our cytological analysis.

A brief resume of Dr. SAILER's hybridization experiments may be given as follows:

Copulation between a *T. perditor* female and a *T. custator* male was observed on three occasions, but the matings produced no young.

Copulation between the closely related *T. custator* and *T. pallidovirens* occurred readily, eggs were laid in normal numbers and the young hatched and grew to maturity without difficulty.

A single *T. calceata* female copulated with several different *T. pallidovirens* males and laid two batches of eggs, numbering 59 and 48 respectively. Of the first batch, 42 eggs hatched, but all except two nymphs died in the second instar. The two surviving nymphs died in the third instar. Of the second batch of eggs only 11 hatched and all except 2 died before the fourth instar. These two nymphs reached maturity and both proved to be males which fed readily and were very active. They resembled *T. calceata* more strongly than *T. pallidovirens*, at least on the basis of external characters. It was this pair of hybrid males that served as the basis for further crosses and cytological analysis. The two testes of the hybrid male used for cytological purposes were dissected out by one of us in Dr. SAILER's laboratory and fixed in Sanfelice and Carnoy's fluid respectively — the first for a study of chromosome behavior, and the other for cytochemical tests. The second hybrid male was back-crossed to six different *T. pallidovirens* females. At least five different copulations were observed and more than 300 eggs were laid by these females. The very great majority of these did not hatch but one small batch of 11 eggs gave rise to ten nymphs. These did not reach the second instar; so far as one could tell, they were predominantly *T. pallidovirens* in appearance.

Material for cytological study was fixed in Sanfelice and Carnoy's fluid (absolute alcohol 3: acetic acid 1) was employed for tissues used for cytochemical analysis. Both Heidenhain's hematoxylin and Feulgen (STOWELL method) were used for staining. Cytophotometric measurements of the relative amount of deoxyribose nucleic acid (DNA-Feulgen) were made by the method of POLLISTER and RIS (1947) with the apparatus and methods described by ANSLEY (1954). Sections of testes of the species to be compared were mounted together on the same slide; adjacent sections on a separate slide served as non-hydrolyzed controls. As a standard for evaluating possible differences in staining among the slides used, sections of a mantid testis containing spermatid nuclei highly uniform in DNA content were added to each slide. In addition certain slides carried sections of the testis of *Arvelius albopunctatus*, to permit comparison with other pentatomids. The extinction of the cytoplasm adjacent to the nuclei measured was checked and in all instances proved negligible as did both cytoplasm and nuclei of the controls.

Except where specially noted in the figure legend, all drawings were made from preparations stained with Feulgen.

III. Cytology

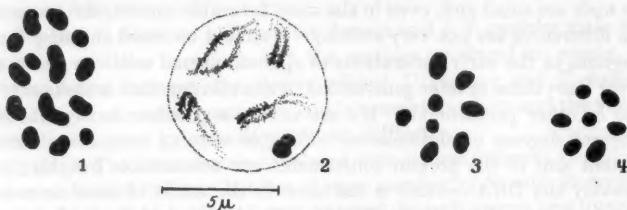
It is unfortunate that, compared with many other pentatomids with which the senior author is familiar, the species of *Thyanta* offer inferior conditions for chromosome study. The germ cells and chromosomes of the male are small and, even in the most favorable species, chromosomal size differences are not very striking. It should be noted that the chromosomes in the early generations of spermatogonial cells are distinctly larger than those of later generations; a size relation that is encountered also in other pentatomids. We are not in a position to say whether different degrees of chromosome coiling or varying amounts of water content and of the protein constituents are accountable for this; presumably the DNA content is the same in the nuclei of most tissues of any given individual. In the meiotic cells, the size and shape of chromosomes seems to be less subject to variation than in any other tissue. Nevertheless, as long as our knowledge of the factors that determine chromosomal volume is still so incomplete, interpretations based merely on size — unsupported by other types of evidence — had best be regarded as only suggestive.

1. *Thyanta perditor* FABRICIUS

This species which ranges from the southern border of the United States, through Central and South America, as far as Argentina, is in its general cytological features a typical pentatomid. The diploid chromosome complement of 14 chromosomes comprises 6 pairs of autosomes with an XY in the male, and 2 X in the female. One pair of autosomes is distinctly larger than the others, four pairs are intermediate in size, and the last pair is readily recognisable as the smallest. The X chromosome is of about the same size as one of these small autosomes and the Y is the smallest chromosome of the complement (Fig. 1).

Closely paralleling the meiotic processes of most other pentatomids males, the X and Y are positively heteropycnotic, beginning with the early prophase. In the confused stage there is a tendency for the two condensed sex chromosomes to come together and this may persist into diakinesis (Fig. 2). Whether such a temporary union occurs or not, the sex chromosomes usually appear vacuolated during this period. In prometaphase they once more separate from each other and become homogeneous in appearance. In the first spermatocyte metaphase they usually, though not always, occupy the middle of a ring formed by the 6 autosomal bivalents (Fig. 3) and divide equationally in the ensuing division. They undergo a "touch and go" pairing on the metaphase plate of the second spermatocyte, prior to segregating to opposite poles in the anaphase that follows (Fig. 4). As has already been noted, all

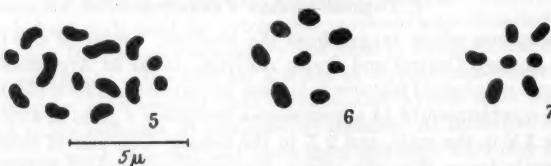
this conforms strictly to the general pattern of male meiosis in the *Pentatomidae* and, as a result, two types of spermatids are formed: $6+X$ and $6+Y$. The female meiosis was not studied, but it may safely be assumed that all mature eggs carry 6 autosomes + X.



Figs. 1—4. *T. perditor*. Fig. 1. Spermatogonial metaphase, with 14 chromosomes. Fig. 2. Early diakinesis. Fig. 3. Metaphase I, with typical placement of X and Y in the middle. Fig. 4. Metaphase II, with X and Y superimposed in the middle

2. *Thyanta pseudocasta* BLATCHLEY

Little need be said about the cytology of this species because, like *T. perditor*, it conforms closely to what is typical of most pentatomids.



Figs. 5—7. *T. pseudocasta*. Fig. 5. Spermatogonial metaphase, with 14 chromosomes. Fig. 6. Metaphase I. The Y is the smallest of the set. Fig. 7. Metaphase II, with X and Y superimposed in the middle

The chromosome complement is very similar to that of *T. perditor* in that the largest and smallest pair of autosomes are easily distinguished whereas the other 4 pairs closely resemble each other (Fig. 5). Again the X is similar to the smallest autosomes in size, and the Y is the smallest of the chromosomes. The sex chromosomes often, but not always, take a central position in the first metaphase plate (Fig. 6) and segregate from each other in the second division (Fig. 7).

3. *Thyanta antiquensis* WESTWOOD

This species has chromosomal conditions very similar to the two tropical species already described. The chromosome complement has the same number and general size relations, but the largest pair is only slightly larger than the medium sized autosomes (Fig. 8). The config-

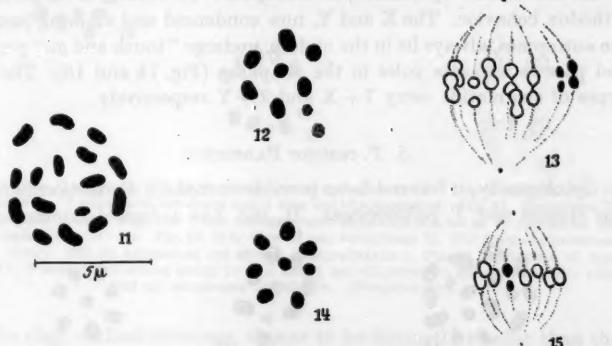
uration in the first spermatocyte is very similar to that of *T. pseudocasta* (Fig. 9) and the second division is reductional for the sex chromosomes (Fig. 10).



Figs. 8—10. *T. antiquensis*. Fig. 8. Spermatogonial metaphase, with 14 chromosomes. Fig. 9. Metaphase I. The Y is the smallest of the set. Fig. 10. Metaphase II, with X and Y superimposed in the middle

4. *Thyanta pallidovirens* STAL.

This *Thyanta* of the Eastern temperate region of the United States differs from the three tropical species already described in having an additional pair of autosomes. One of these pairs is only slightly larger



Figs. 11—15. *T. pallidovirens*. Fig. 11. Spermatogonial metaphase with 16 chromosomes. Fig. 12. Metaphase I. Sexchromosomes showing slightly negative heteropycnosis, are placed outside of autosomal grouping. Fig. 13. Side view of late Metaphase I. X and Y shown in black. The Y is the smallest chromosome (Hematoxylin). Fig. 14. Metaphase II, with X and Y superimposed in middle. Fig. 15. Metaphase II in side view. X and Y in middle undergoing "touch and go" pairing. (Hematoxylin)

than the 5 pairs of intermediate size, and here too there is one small pair that is easily distinguished from the other autosomes. The X and Y have the same general size relations to the autosomes as in the tropical *Thyanta* species, the X being close to the smallest autosome in its dimensions while the Y is the smallest chromosome of the set (Fig. 11).

In their meiotic behavior the sex chromosomes evince some slight differences from that described in the preceding species. Both X and Y are positively heteropycnotic during the earlier prophase stages, but

in late diakinesis and prometaphase they tend to become negatively heteropycnotic as compared with the condensing autosomes. This change, unusual in pentatomids, is not observable in preparations stained with hematoxylin, where autosomes and sex chromosomes stain with equal intensity. But in material subjected to the Feulgen reaction, both sex chromosomes appear less deeply stained even on the first metaphase plate (Fig. 12).

Further, though exceptions to the central placement of the sex chromosomes in the first spermatocyte metaphase are sometimes encountered in all pentatomids, the present species only occasionally shows the typical configuration. Instead, the X and Y usually lie distinctly outside of the autosomal ring, with the seventh or smallest autosomal bivalent occupying the central position (Fig. 12 and 13). It is possible that this alteration of the more usual pentatomid arrangement is correlated with the heteropycnotic changes just noted.

In the second spermatocyte metaphase we return to a perfectly orthodox behavior. The X and Y, now condensed and staining just like the autosomes, always lie in the middle, undergo "touch and go" pairing, and pass to opposite poles in the anaphase (Fig. 14 and 15). The two types of spermatids carry $7+X$ and $7+Y$ respectively.

5. *T. custator* FABRICIUS

Cytologically, it has not been possible to make a distinction between this species and *T. pallidovirens*. It, too, has a diploid number of 16

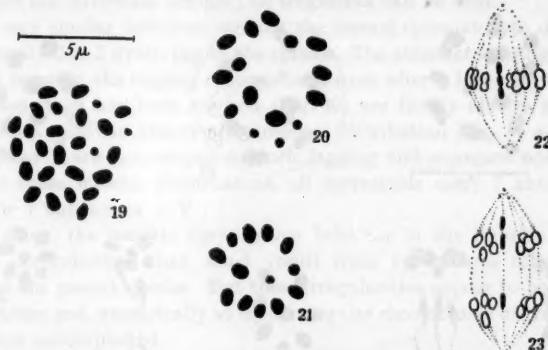


Figs. 16—18. *T. custator*. Fig. 16. Spermatogonial metaphase, with 16 chromosomes. Fig. 17. Metaphase I. Sex chromosomes negatively heteropycnotic. Fig. 18. Metaphase II. Sex chromosomes superimposed in middle

chromosomes (Fig. 16) and it shares with *T. pallidovirens* the exceptional behavior of the X and Y in heteropycnotosis and asymmetrical placement in the first metaphase (Fig. 17). There is no need of describing the further meiotic behavior, which parallels that of *T. pallidovirens* in every respect (Fig. 18). It is likely that the species that WILSON (1911) dealt with as *T. custator* was in reality the species called *T. pallidovirens* in the present investigation. His observations were confirmed by our own findings and hold for either of the two species.

6. *Thyanta calceata* SAY

This species, which for so many years was considered identical with *T. custator*, has decidedly different chromosome conditions. The male has a diploid complement of 27 chromosomes (12 pairs of autosomes + $X_1 + X_2 + Y$), while the female has 28 chromosomes (12 pairs of autosomes + $2X_1 + 2X_2$). Of these, 9 pairs of autosomes are of approximately the same size, 3 pairs are somewhat smaller, and the 2 members of the compound X as well as the Y are extremely small and indistinguishable from each other (Fig. 19). The spermatogonial chromosomes,



Figs. 19—23. *T. calceata*. Fig. 19. Spermatogonial metaphase with 27 chromosomes. Fig. 20. Metaphase I. 12 autosomal bivalents and 3 tiny sex chromosomes. Fig. 21. Metaphase II. 12 autosomal dyads, with the 3 sex chromosomes superimposed so as to appear as one chromosome in polar view. Fig. 22. Side view of late Metaphase II. The 3 sex chromosomes form a chain. Not all autosomes are shown. (Hematoxylin.) Fig. 23. Side view of Anaphase II. 2 sex chromosomes going to one, and 1 sex chromosome going to opposite pole. Not all autosomes are shown. (Hematoxylin)

even in their earliest divisions, appear to be distinctly smaller than the corresponding spermatogonial chromosomes of any other *Thyanta* species, but this distinction in size is not so striking when the meiotic metaphase chromosomes are compared.

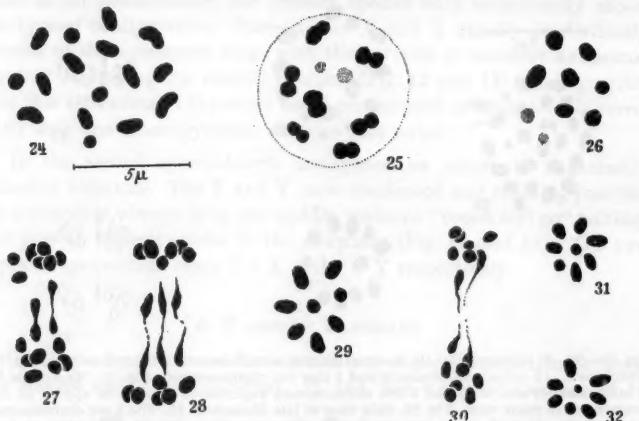
No regularity is observed in the disposition of the chromosomes in the first spermatocyte metaphase. The 3 sex chromosomes evince no marked tendency to take a central position and in many instances are found in a distinctly peripheral region of the chromosome arrangement (Fig. 20). In the second division about half of the metaphases show the sex chromosomes more or less centrally placed, but often one or two autosomal dyads may also be in this middle position and in only three out of twenty metaphases did the autosomes form a distinct ring (Fig. 21).

As WILSON (1911) has already reported, the 3 sex chromosomes form a chain lying parallel to the long axis of the second meiotic spindle

(Fig. 22). This represents the "touch and go" pairing that is seen in more simple form in most other pentatomids. Two contiguous members of the chain segregate to one pole; the third, which corresponds to the Y, goes to the opposite one (Fig. 23).

7. Hybrid: *T. custator* ♀ × *T. pallidovirens* ♂

These two forms recognized as distinct species by RUCKES and SAILER (1956) are obviously closely related. Successful crosses between them are made with relative ease and the offspring resulting from such crosses



Figs. 24—32. Hybrid: *T. custator* ♀ × *T. pallidovirens* ♂. Fig. 24. Spermatogonial metaphase with 16 chromosomes. Fig. 25. Late diakinesis. Sex chromosomes negatively heteropycnotic. Fig. 26. Metaphase I. Sex chromosomes negatively heteropycnotic. Fig. 27. Anaphase I with 2 lagging bivalents. Fig. 28. Anaphase I with 3 lagging bivalents. Fig. 29. Metaphase II. Fig. 30. Late Anaphase II with 2 lagging dyads. Fig. 31. Late Anaphase II. Polar view of one daughter group, with X in middle. Fig. 32. Same figure as preceding, but at lower focus. Other daughter group with Y going to opposite pole.

have the expected diploid number of 16 chromosomes (Fig. 24). Meiotic pairing of the chromosomes in the hybrids is regular and 7 autosomal bivalents are formed in all cases (Fig. 25). As in the parent species, the sex chromosomes are negatively heteropycnotic at prometaphase and first metaphase (Fig. 25 and 26). But in both the first and second metaphases the autosomes and sex chromosomes very frequently fail to form a flat equatorial plate though the degree of this irregularity appears to vary in different individuals, and is less marked in the second than in the first metaphase. Again, as in both parent species, the sex chromosomes tend to occupy a peripheral position in the first metaphase grouping (Fig. 25), and a more central one in the second (Fig. 29). A

much more striking departure from the normal chromosome behavior lies in the fact that 2 or 3 bivalents have difficulty in dividing and, in the great majority of late anaphases, such bivalents lie, greatly extended, between the two groups of dyads that have almost reached the poles (Fig. 27 and 28). Nevertheless, a successful division of these lagging bivalents is finally always brought about and all second metaphases show the 7 dyads and the X and Y that would result from a perfectly normal and orthodox division (Fig. 29). The chromatin bridges that are formed in the process and attest the difficulty in the division of such bivalents are not inversion bridges; no fragments can be seen.

A very similar behavior attends the second spermatocyte division and usually 2 or 3 dyads lag on the spindle. The attenuated bridges that extend between the lagging chromosomes even after a late anaphase or telophase stage has been reached (Fig. 30) are finally always severed and do not result in abnormal, numerical distribution (Fig. 31 and 32). The X and Y are not subject to such lagging and segregate normally. Despite these meiotic disturbances, all spermatids carry 7 autosomes + X, or 7 autosomes + Y.

In short, the meiotic chromosome behavior in the hybrids shows certain irregularities that must result from cytogenetic differences between the parent species. But these irregularities appear to be minor in character and, numerically at least, a regular chromosome distribution is always accomplished.

8. Hybrid: *T. calceata* ♀ × *T. pallidovirens* ♂

As has already been noted above, some of the attempts to cross these two species were successful in producing offspring and, though nearly all of these died before reaching maturity, 2 adult hybrid males were actually obtained. Moreover, when one of these hybrids was used in a back cross to a *T. pallidovirens* female, several dozen young were produced. Though all the offspring from this backcross died in an early instar, they represent conclusive evidence that some of the sperm of their hybrid male parent were functional.

This is a surprising fact for it must be remembered that *T. calceata* has 12, while *T. pallidovirens* has only 7 pairs of autosomes. Meiotic difficulties in the germ cells of the hybrids, therefore, might confidently be expected. Indeed, that is the attitude of DARLINGTON and MATHER (1949, p. 323) who in their consideration of chromosome behavior in hybrids take occasion to make the following statement: "In a species of *Thyanta*, WILSON in 1911 found two races, one with 7 and the other with 12 pairs of chromosomes. Obviously these two races, not previously distinguished, would be intersterile and were indeed described (after the event) as distinct species."

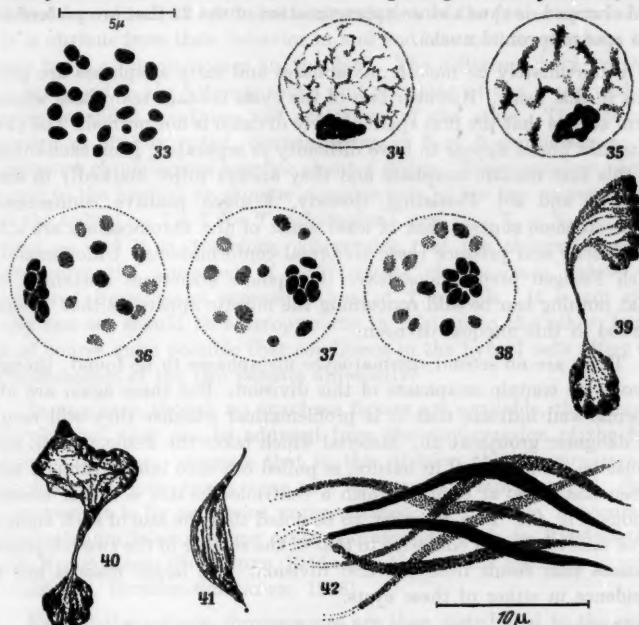
The fact that we found, nevertheless, that hybridization could be brought about and that at least two of the hybrid males produced some functional sperms, obviously calls for a cytological analysis. A testis of one of the hybrid males was fixed in Sanfelice and the sections were stained with Feulgen (the other testis was reserved for cytochemical tests). Both of these testes were distinctly smaller than the average *Thyanta* testis though, in general structure, they showed no striking peculiarities.

The spermatogonial cells give no evidence of abnormality in their divisions. All spermatogonial metaphases in which reliable counts could be made, carry 22 chromosomes (Fig. 33) and that is what is to be expected from the combination of a *T. calceata* egg ($12 + X_1 + X_2$) with a *T. pallidovirens* sperm ($7 + X$ or $7 + Y$). As has already been noted, most of the chromosomes in either parent are not easily distinguished from each other, and in the hybrid nuclei only the $2X$ chromosomes of *T. calceata* and the largest autosome of *T. pallidovirens* can be readily recognized.

However, irregularities and difficulties manifest themselves as soon as the meiotic period commences. The cells of many cysts begin to show pycnotic degeneration very soon after the last spermatogonial division. Such degeneration often involves all the cells of an affected cyst at an early stage of meiosis. If the onset of degeneration is delayed to a later stage, the effect is sometimes less general and some cells in such cysts may continue their development. But these partially successful cysts are in the minority and a general survey of the testis shows that at least $2/3$ of all the cysts show a total pycnosis while none are entirely free of it. As a consequence of this widespread degeneration it becomes difficult to trace the sequence of meiotic phases and several steps of the meiotic process are not represented in this testis at all.

The youngest meiotic nuclei that have not been stopped in their development appear to be in an early leptotene stage. But a more definite recognition and analysis are not possible until stages involving a considerable increase of volume are encountered. Such an increase is usually correlated with the late diplotene and the confused stages, and the cells here in question are of the latter type. In them a portion of the chromosomal material is distributed through the nuclear space in the loose, diffused condition that is typical of hemipteran chromosomes in the confused stage, while rather close to the nuclear wall lies an irregular, heteropycnotic clump of chromosomes. Since the sex chromosomes would hardly be expected to form so large an aggregate as this heteropycnotic mass, it is probable that some autosomes are included in it also (Fig. 34).

In what corresponds to an early diakinesis stage, the nuclei have usually reached their maximum size. The chromosomes, condensing after their earlier diffuse condition, are evidently univalent. This clearly indicates that there is no meiotic pairing in the hybrid or, if it



Figs. 33-42. Hybrid: *T. calceata* ♀ × *T. pallidovirens* ♂. Fig. 33. Spermatogonial metaphase with 22 chromosomes. Fig. 34. Confused stage with heteropycnotic aggregate at one side. Fig. 35. Early diakinesis. There are no bivalents. Fig. 36, 37, 38. Prochromosome stages with 11 to 13 scattered chromosomes, and an aggregate of 8 or 9 heteropycnotic chromosomes. Fig. 39. Telophase I showing unusual character of first division. Fig. 40. Telophase I. Unequal daughter nuclei involving stringy, Feulgen positive chromosome material. Fig. 41. Anaphase II, showing abnormal character of stringy, Feulgen-positive material between the two poles. Fig. 42. Sperms, in late stage of development (drawn at lower magnification than all the other figures)

has occurred at an earlier stage, the chromosomes have separated again by the time that this stage has been reached. The heteropycnotic chromosomes that compose the aggregate at one side of the nucleus now have become more definite in outline though it still is difficult to count them (Fig. 35).

The next stage is the prometaphase, at which time there are from 11 to 13 univalents scattered through the nucleus. The clump of hetero-

pycnotic chromosomes is still present as such and though even now it is not possible to make conclusive counts of the chromosomes that are involved in it, it is safe to say their number lies between 7 and 10 (Figs. 36, 37, and 38). The total number of chromosomes, both scattered and clumped, is thus a close approximation of the 22 that are present in the spermatogonial nuclei.

Unfortunately no meiotic metaphases and early anaphases are present in this testis. However two of the cysts contain telophases whose form attests that the first spermatocyte division is not normal. The two daughter nuclei appear to have difficulty in separating from each other in this first meiotic anaphase and they always differ markedly in size (Fig. 39 and 40). Persisting, thready, Feulgen positive connections between them suggest that at least some of the chromosomes are soft and sticky and produce these abnormal conformations. Unfortunately such Feulgen preparations leave the spindle structures unstained so that nothing can be said concerning the mitotic apparatus that is concerned in this unequal division.

There are no second spermatocyte metaphases to be found, though two cysts contain anaphases of this division. But these again are abnormal and indicate that it is problematical whether they will result in daughter groups at all. Material which takes the Feulgen stain and must be chromosomal in nature, is pulled out into lumpy threads between the poles, at each of which a centriole-like dot is rather conspicuous (Fig. 41). It is, however, to be noted that the size of such anomalous mitotic figures conforms to that of the smaller of the two telophasic masses that result from the first division. The larger mass is not in evidence in either of these cysts.

In view of the immense amount of degeneration in the testis as well as the abnormality of the meiotic divisions in the relatively few nuclei that survive these destructive processes, it would appear doubtful that any functional sperms can ever be produced. It came as a surprise, therefore, that this testis has two cysts near the lower end of the testis which contain a few sperms that have reached what BOWEN (1922b) calls Stage *o* or *p* in spermiogenesis (Fig. 42). These bundles of sperms each contain from 15 to 18 sperms, a very small fraction of the hundreds of sperms that are included in the bundles of a normal pentatomid testis. However, there is thus cytological evidence, conclusive enough that, despite everything, a few nuclei now and then win through to the last stages of sperm formation. Needless to say, the fact that offspring were produced by the brother of this male in a backcross to *T. pallidovirens*, is final proof that some functional sperms may be formed in the hybrid males.

Dr. SAILER is of the opinion that the offspring from this backcross resembled *T. pallidovirens* more closely than *T. calceata*. Though it is difficult to draw final conclusions on this aspect in nymphs of so early an instar, that observation together with the cytological findings described here, justify a tentative interpretation of the processes involved. It is obvious from their behavior in mid and late meiotic prophase that two types of chromosomes are involved. The difference between them is expressed in the heteropyknosis and clumping of one group and the more extended condition and scattering of the other. The clumped group, as already noted, contains close to 8 or 9 chromosomes; the scattered chromosomes number about a dozen. These numbers correspond to the haploid or gametic complements of the two parent species of the hybrid — $7 + Y$ for *T. pallidovirens*, and $12 + X_1 + X_2$ for *T. calceata* — and it is, therefore, conceivable that the clumped group is predominantly composed of *pallidovirens* chromosomes, while the scattered chromosomes represent those of *T. calceata*. It is not clear why one set should be heteropyknotic in relation to the other, but it is of course quite possible that conditions in the hybrid cells affect the chromosomes of the two parents differently.

In any case, though no anaphase figures are available, the unequal distribution, that can be adduced from the configuration of the first meiotic telophase, suggests that in this division the chromosomes of the heteropyknotic group move as a unit, perhaps still clumped. Such a movement is by no means unprecedented; for instance, it occurs in the harlequin lobes of some other pentatomids, such as *Brachystethus* and *Mecistorhinus* (SCHRADER, 1946a and 1946b), and regularly in some coccids (cf. HUGHES-SCHRADER, 1948).

Even if the *calceata* chromosomes are then distributed to the poles at random, such chance distribution will often result in nuclei which are predominantly *pallidovirens* in chromosomal constitution. As a matter of fact, the regular occurrence of a large and a small group in every telophasic configuration suggests that the scattered chromosomes may also move more or less together to form the larger of the two groupings.

So far as the available scant evidence goes, only the smaller (or predominantly *pallidovirens*) nucleus attempts the second spermatoocyte division. It is, therefore, likely that this has a better chance of reaching the mature sperm stage and, therefore, such sperms are chiefly *pallidovirens* in their chromosome content. Hence in a backcross, the normal *pallidovirens* eggs would be fertilized by hybrid sperms that carry a majority of *pallidovirens* chromosomes and this would account for the unexpected production of offspring from such a cross. It is a case in

which the expectation founded on generally accepted cytogenetic tenets is not realized because the chromosomes do not follow the orthodox rules that have been laid down for the meiosis of hybrids.

IV. Cytophotometry of DNA

Cytophotometric measurements of the relative amount of DNA (deoxyribose nucleic acid — Feulgen) in individual nuclei were made for each of the 6 species and 2 interspecific hybrids of *Thyanta* cytologically studied. Such determinations, by measuring a universal and relatively stable chromosomal component, afford an objective index of the total chromosome content characteristic of a species and as such should be useful in the analysis of evolutionary relationships. Spermatid nuclei, usually favorable material for cytophotometry, are so small and so low in DNA content in *Thyanta* that measurement proved difficult and for most of the work recourse was had to the confused stage of the primary spermatocyte, just prior to diakinesis. At this stage in meiosis, synthesis of DNA for the ensuing meiotic divisions is usually already complete. That this holds true for *Thyanta* is shown by the fact that in each species the DNA content of confused stage nuclei was approximately 4 times that of spermatid nuclei. (Actually the mean of spermatid measurements proved regularly somewhat less than 1/4 that of the confused stage — a finding attributable to the difference in chromatin distribution in the two nuclear types.)

The results are presented in Fig. 43, 44 and 45 as histograms in which the relative amount of DNA in the individual nuclei is plotted against the number of nuclei measured. The data in the three figures are derived from different slides but direct comparison is valid between, as well as within, the groups of data. This was assured by measuring the DNA content of nuclei in a mantid testis used as a "standard" — sections of which were mounted on each slide. The DNA content of the standard nuclei was identical on all slides except one from which the data of Fig. 45 are derived. These data have accordingly been corrected by a factor which equates the standard value with that of the slides used for Figs. 43 and 44.

1. DNA in *Thyanta*

All 6 species of *Thyanta* studied show a surprising uniformity in nuclear content of DNA. The mean amount of DNA per nucleus, expressed in arbitrary units at the 4 n level, ranges only from a high of 1.1 ± 0.03 in *perditor*, to a low of 0.89 ± 0.02 in *antiguensis* (Figs. 43 and 45). The difference in the DNA index between *perditor* and each of the other species, although slight, is statistically significant, as is also the difference between the two second highest species (identical

in DNA values) — *pallidovirens* and *custator* — on the one hand, and the lowest — *antiguensis* — on the other hand. All other interspecific differences are well below the level of statistical significance.

Of special interest is the relation between *calceata*, with its 28 chromosomes, and the 16 chromosome form, either *pallidovirens* or *custator*, first studied by WILSON. *T. pallidovirens* and *custator* are identical in DNA index as is shown by a comparison of their spermatid nuclei in Fig. 45; here the mean DNA values are 0.218 ± 0.007 and 0.216 ± 0.007 respectively. In turn *pallidovirens* shows no significant difference from *calceata*, as is seen in the comparison of the 4 n values of confused stage nuclei in Fig. 44, a finding which bears on the evolutionary relationship of these species.

Nor is any significant difference in DNA index demonstrable between the more northern, 16 chromosome species — *pallidovirens* and *custator* — and the more southern and tropical *pseudocasta* and *antiguensis* which retain the 14 chromosome complement so typical of the Pentatomidae. Indeed *perditor*, the third of the southern forms studied, whose DNA index is significantly higher than all the other species tested, carries the typical complement of 14 chromosomes.

2. DNA in Hybrids

The DNA index of hybrids from the *custator* ♀ × *pallidovirens* ♂ cross was determined by comparison of spermatid nuclei from a hybrid

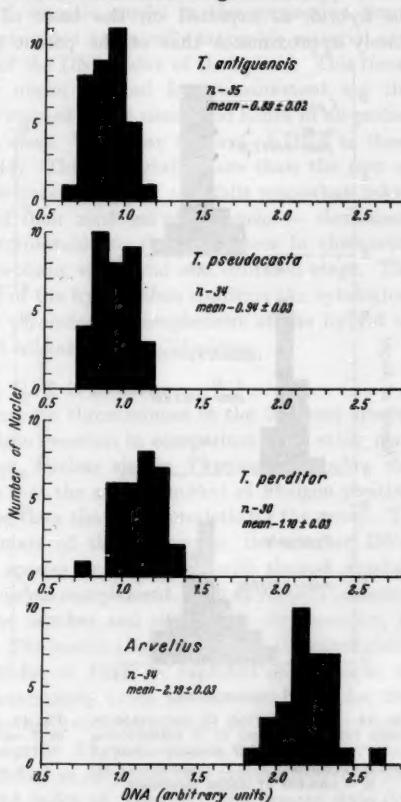


Fig. 43. DNA content of spermatocyte nuclei (confused stage) of *T. antiguensis*, *T. pseudocasta*, *T. perditor* and *Arvelius albopunctatus*; n = number of nuclei measured

male with those of a male from each of the two parental species. The results (Fig. 45) show, as noted above, the identity of the parental types in the nuclear content of DNA. The DNA index of the hybrid, as expected on the basis of the cytological evidence, closely approximates that of the parent species.

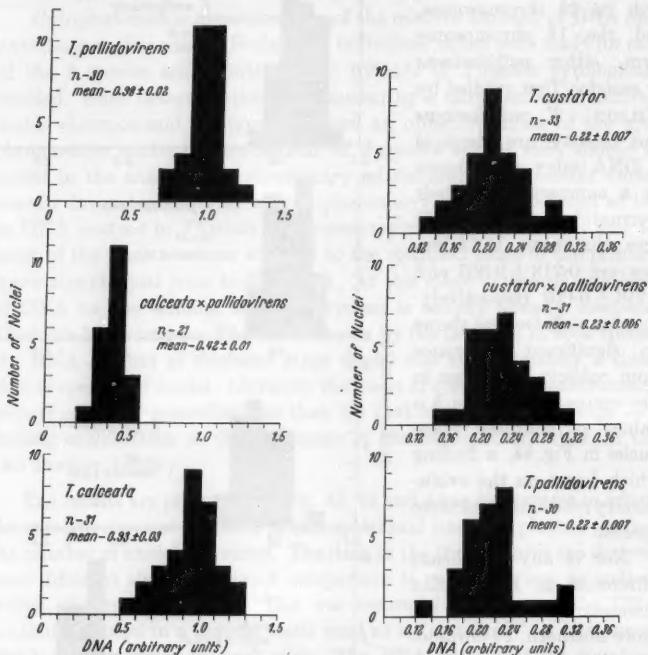


Fig. 44. DNA content of spermatoocyte nuclei (confused stage) of *T. pallidovirens* and *T. calceata*, and of somatic nuclei of hybrid (*T. calceata* ♀ × *T. pallidovirens* ♂); n = number of nuclei measured

Fig. 45. DNA content of spermatid nuclei of *T. custator*, *T. pallidovirens*, and hybrid (*T. custator* ♀ × *T. pallidovirens* ♂); n = number of nuclei measured

A characterization, in terms of DNA values, of the hybrids from the *calceata* ♀ × *pallidovirens* ♂ cross was also attempted by a comparison of nuclei from a hybrid testis with those of males representing the two parental species. Unfortunately, in the aberrant meiosis of the hybrid male there occurs no stage technically favorable for photometry. A sample of 25 nuclei in the late prophase stage shown in Fig. 34 gave a mean DNA value significantly higher and a wider range of variation than confused stage nuclei in the parental types. This is not surprising,

since in the hybrid nuclei of this stage one-third of the chromosomes form a heteropycnotic aggregate; the chromatin distribution is thus so different from that of normal nuclei as to invalidate the comparison. However, a limited number of somatic nuclei in the connective tissue investing the *vas deferens* provided technically favorable material and permitted a determination of the DNA index of the hybrid. This tissue is variably polyploid; the nuclei selected for measurement are the smallest and least intensely stained in the tissue and hence in all probability represent the diploid class. The mean amount of DNA in these nuclei is $0.42 + 0.01$ (Fig. 44). This is slightly more than the sum of the spermatid values of the parental types, and falls somewhat below one-half of the $4n$ value of their confused stage nuclei — deviations from the expected ratio attributable to the differences in chromatin distribution in somatic interphase, spermatid and confused stage. The diploid somatic DNA index of the hybrid thus confirms the cytological evidence, which shows the chromosome complement of the hybrid to combine the haploid sets of *calceata* and *pallidovirens*.

3. DNA in *Arvelius*

Interphase nuclei and mitotic chromosomes of the *Thyanta* species give a relatively weak Feulgen reaction in comparison with other pentatomids. Since, in addition, nuclear size in *Thyanta* falls below the pentatomid norm it follows that the actual amount of Feulgen-positive material in the nuclei is less than that characteristic for the group. To obtain a quantitative estimate of this difference, the nuclear DNA content of several *Thyanta* species was compared with that of *Arvelius albopunctatus*, whose chromosome complement, both as regards intensity of Feulgen staining and the number and size of the chromosomes, is typical of the *Pentatomidae*. The results (Fig. 43) confirm the cytologist's expectation: the mean amount of DNA in confused stage nuclei of *Arvelius* proves to be approximately twice the average value for the *Thyanta* species, and is precisely twice that found in *T. perditor* whose DNA index is highest among the *Thyanta* species measured. Further comparative studies are required to ascertain how representative of the group as a whole is the DNA index of *Arvelius*. The present data do, however, demonstrate that a change of the magnitude of approximately 100% in the nuclear content of DNA — with no accompanying change in chromosome number — has occurred during the evolutionary diversification of the Tribe *Pentatomini*.

V. Discussion

The great majority of the *Pentatomidae*, ranging over all of the temperate and tropical zones, is characterized by a diploid chromosome complement of $12 + X + Y$ in the male, and $12 + 2X$ in the female. It

is therefore a reasonable assumption that the tropical *Thyanta* species which conform to this common chromosome formula, represent the basic species of the genus. By the same token, *T. custator* and *T. pallidovirens*, which have added a pair of autosomes to the ordinary complement, and *T. calceata*, which has doubled its number, are not to be regarded as primitive species. In our considerations of the relationships of the various *Thyanta* species it was the origin of the high number of chromosomes in *T. calceata* that constituted the central problem.

Very little information was gained concerning the evolutionary descent of the two northern species, *T. pallidovirens* and *T. custator*. Their cytology and the results of hybridization experiments indicate clearly that the two species are closely related, but the source of the extra pair of autosomes present in both — whether by fragmentation or duplication — is an open question at present.

Similarly a consideration of the derivation of *T. calceata* can not go beyond a weighing of the various possibilities. *T. calceata* and *T. pallidovirens* are sympatric over much of their range and it is conceivable that the latter is the ancestral species of the two. But this would involve the assumption that the chromosomes of one or both species have, since the time of origin of *T. calceata*, undergone such radical alterations that meiotic pairing is no longer possible. This is conceivable of course, but it is equally, or perhaps more, likely that both of these northern forms descended from one or two tropical species. We are obviously moving on speculative ground that involves many unknown factors.

However, the purely cytological questions that are represented in the high chromosome number of *T. calceata* offer the possibility of a somewhat more rewarding examination and it is with these cytological aspects that the following discussion is concerned.

1. *Polyplody*

The chromosome complement of *T. calceata* — $24 + X_1 + X_2 + Y$ for the male, and $24 + 2X_1 + 2X_2$ for the female — is an unusually high one for a member of the *Pentatomidae*. The fact that the only other *Thyanta* species, cytologically known until now, has the lower formula of $14 + X + Y$ and $14 + 2X$, for the male and the female respectively, has frequently led to a consideration of the possibility that polyplody is somehow involved in the origin of the higher number. This possibility is strengthened by our own findings that the tropical species studied by us carry the characteristic pentatomid complement of $12 + X + Y$ and $12 + 2X$ in the two sexes. With this as a basis, the high number of *T. calceata* could be attained by a simple doubling, with the subsequent loss of one of the Y chromosomes, a loss that is not an inconceivable happening.

This brings up once more the role of polyploidy in the evolution of bisexual animals. There is no question that, as compared with plants, it has played a much less obvious role in the origin of new species. WHITE (1946, 1954) doubts that evolution in bisexual animals has been influenced at all by polyploidization and points out that even in such groups as the *Lepidoptera* (LORKOVIC, 1941, 1949) and the *Dermaptera* (BAUER, 1947), the evidence for polyploidy is not conclusive. This may well be conceded without abandoning the case for polyploidy altogether. It should, however, be remembered that attempts to explain the chromosomal series existing in such groups on a basis different than that of polyploidy have likewise met with great, perhaps even more serious, difficulties.

In view of recent surveys such as that of WHITE (1954), a renewed consideration of the polyploid origin of species is hardly warranted. However, it may not be amiss to point out that the argument of MULLER (1925), which has so often been used to contravene the proponents of the polyploid origin of some species, does not have such general applicability as is frequently assumed. That argument, it will be remembered, points out that the doubling of a chromosome complement involving an XY pair of sex chromosomes will of course give rise to a tetraploid individual with 2X and 2Y. This would permit the formation of a X bivalent and a Y bivalent in meiosis, which in turn would assure that all sperms carry XY. When such sperms fertilize the XX egg of a tetraploid female, the resulting offspring would carry XXXY and would be intersexes with no possibility of continuing the tetraploid race. This argument, while holding for *Drosophila*, is not valid for all other species. Aside from such findings as that in *Melandrium*, where XXXY individuals are not intersexes but function as male (WARMKE and BLAKESLEE, 1939; WESTERGAARD, 1940), it should be remembered that a doubling of the sex chromosomes, as for instance in the males of some pentatomids, does not result in the formation of X bivalents and Y bivalents (BOWEN, 1922a). Instead, the 2X and 2Y chromosomes retain their character as univalents in meiosis, and it may be assumed accordingly that they segregate at random in the reduction division. As a result sperms carrying X, Y, XY, XXY, and XYY will be formed, but also sperms with XX and with YY. These last two types of sperms, in fertilizing XX eggs, would produce XXYY and XXXX individuals like the parents and it is theoretically possible that enough of these would result to continue the tetraploid race. The same reasoning in even simpler form would of course apply to species in which the male is XO, for here also there are cases—for instance in the *Coreidae* (WILSON, 1932) and the grasshoppers (MICKEY, 1944)—where the presence of 2X in the male meiotic cells does not result in their pairing and bivalent formation. It may be objected that,

in these various instances, tetraploidy was perhaps brought about after the prophase period of chromosome pairing had been passed, but the evidence is convincing that the doubling of the chromosome complement occurred long before meiosis.

All this is merely to say that if polyploidy has been a negligible factor in the origin of new animal species, the reasons so far adduced for this situation are not very satisfying. So far as the analysis of suspected cases of polyploid species is concerned, a different attack than a purely cytological one is obviously called for. In the case of *T. calceata* such a different attack has gone far to answer the question; the photometric measurement of the amount of DNA in the nuclei of the species established that it is very close to that carried by the more typical species of *Thyanta*. This deals a heavy blow at the hypothesis of a polyploid origin of *T. calceata*, for it might reasonably be expected that, despite chromosomal changes since the time of such an origin, the species would still carry a considerably higher quantity of DNA. To maintain the claim for polyploidy any further, one would have to suppose that there is a tendency for large quantitative variations of DNA to return to a certain physiological norm for the genus and that *T. calceata* has accomplished such a return. But this would involve us in so much speculation in a still unknown territory that it may well be laid aside for the present. The best available evidence argues strongly for a non-polyploid origin of *T. calceata*.

2. Fragmentation

In view of the fact that the chromosomes of the *Pentatomidae*, like all *Hemiptera*, have diffuse kinetochores, the possibility of an increase in the chromosome number through fragmentation is worthy of serious consideration (SCHRADER, 1947). This is not to say that nondisjunction and other accidents in the mechanics of chromosomes may not also play a role in adding chromosomes to the basic complement, but it is difficult to believe that such relatively rare alterations could account for a change from the typical 14 chromosomes of a species like *T. perditor* to the 28 of *T. calceata*.

The argument against fragmentation as an agency in numerical changes has recently been put forward again by WHITE (1954). He does not dismiss the agency of fragmentation altogether (see his pp. 197 and 208), but questions whether a simple break can bring about a lasting alteration. His doubts arise from his conviction that in most organisms the two fragments produced by a break usually rejoin and thus obviate any permanent effect. Further, he is dubious about the viability of chromosome fragments if they should not fuse again for, of course, they lack a telomere at the broken end. Hence WHITE argues that translocations and duplicated fragments must also be involved in the fragmentation process (p. 319). The findings of TROEDSSON (1944) that

in the oogenesis of *Hemiptera* with compound X chromosomes, the different components of the X always form typical bivalents and never come together to constitute multivalents he regards as "hardly conclusive evidence in favor of the 'simple fragmentation' hypothesis, neither does it disprove the 'duplicated fragment' interpretation". The lack of conclusiveness being granted, it is nevertheless true that TROEDSSON's findings provide a serious argument against the last named hypothesis.

It is indeed difficult to prove that a simple break may be sufficient to bring about permanent numerical changes. The instances that have been advanced in support of this simplest hypothesis are, however, often very suggestive. One need mention only the interesting findings of HEIZER (1950) in the Hawaiian pentatomid *Oechalia pacifica*. From a small colony of these insects she collected 14 males of which 2 had aberrant chromosomal conditions. Instead of the usual $12+X+Y$, one of these males had a compound X of 2 components as well as an extra pair of autosomes, while the other had an X of 3 components. The size relations, determined on meiotic chromosomes, strongly indicate a fragmentation and, possibly, a very recent one.

Nevertheless, general considerations make it likely that some factor additional to the simple break is at work in any fragmentation that results in permanent numerical changes. Certainly the evidence now available is sufficient to show that, in some groups, fragmentation occurs more readily than in others — even within the *Hemiptera* — so that physiological and structural conditions no doubt have a role in the process (SCHRADER, 1947).

Probably such additional factors are not very complex. This is already apparent in the experiments on coccids and aphids by HUGHES-SCHRADER and RIS (1941) and RIS (1942), who found that chromosome fragments induced by X rays are viable for many cell generations and function normally in mitosis. Some of these fragments must have lacked not only one but both telomeres, which in itself may indicate that telomeres are not equally important in all animals. Admittedly such fragments should be traced for longer periods, but it is difficult to avoid the conclusion that even if they were not yet permanently established as autonomous chromosomes, a comparatively minor alteration beyond the break would make them so.

That the factors controlling the permanency of breaks may rest in the physiological condition of the chromosome or its surroundings was demonstrated by MCCLINTOCK (1938, 1939) who found that, during the meiotic period of *Zea*, there is a strong tendency for the broken ends of chromosomes to rejoin, whereas in the embryo they do not undergo such fusion. In *Zea* we therefore know where to seek the additional factor that makes a break permanent; it is represented in the physiological condition of the cell constituents.

If fragmentation thus gains in respectability as an hypothesis, it must be pointed out that there is still one outstanding question which affects its general acceptability. This arises from the exactness of the numerical doubling that has occurred in the autosomes of *T. calceata*. It was this exactness which primarily gave so much weight to the hypothesis of polyploidization, and it is again this exactness which led LORKOVIC (1941, 1949) to conclude that the series of multiples that are found in the species of certain *Lepidoptera* must also be based on polyploidy. In such genera as *Lycaena* and *Leptidea* the chromosome number of one species is almost precisely doubled in another species and redoubled in a third. The occurrence of these multiples gains additional significance from the fact that no species with intermediate numbers are known in these genera and LORKOVIC, understandably enough, doubts that fragmentation could repeatedly result in such a precise doubling. It may be agreed that that would indeed be asking a great deal of coincidence unless it be assumed that each chromosome has one structural weakness which will always cause it to break into two pieces under certain conditions of stress. This is the very assumption that VANDEL (1938) made some years ago and he sought this vulnerable point in the kinetochore. Our present knowledge makes injury to the kinetochore region a more serious matter than VANDEL realized at that time and, at best, his hypothesis would not apply to the cases of diffuse kinetochore with which we are here concerned. However, it is true that regional differences in the structure of chromosomes have been reported many times in recent years, though in no instance have possible points of weakness had so regular a distribution that a single, transverse break in every chromosome might occur more or less simultaneously. This constitutes an objection to the agency of transverse fragmentation that is not easily surmounted.

But the fragmentation hypothesis in its more general connotations is nevertheless not to be abandoned. The main difficulty for its acceptance lies in the generally held concept that a break in a chromosome must occur transversely. But it is quite within the range of our knowledge of chromosome structure that a chromosome number might be doubled through the separation of the two chromatids that compose each chromosome. This, in effect, is a "longitudinal break" and the possibility of its occurrence will obviously vary with the chromosomal conditions in different groups of animals. In some, as for instance the *Coccoidea*, the chromatids have already gained a considerable degree of independence (cf. HUGHES-SCHRADER, 1948) and in *Protortonia* (SCHRADER, 1931) the chromatids go through the meiotic maneuvers as independent, unconnected units. Obviously, such insects are closer to establishing an autonomy of chromatids than are many other animals and it may not be without significance that in these most striking instances, the chro-

mosomes have a diffuse kinetochore. A slight increase of this autonomy of chromatids might well result in a permanent doubling of the basic number and it may be that this is what has been accomplished in the *Lepidoptera* which have been the subject of LORKOVIC's considerations. This also would account for the decrease in chromosomal size though, as noted elsewhere, size variations do not provide an altogether sound basis for theoretical discussion. Above all, it would account for the fact that the doubling of the chromosome number in *T. calceata* leaves the total amount of DNA unchanged. Finally, though we are here concerned with animal evolution it is interesting that a similar explanation may be applicable to the chromosomal relations that are encountered in species of the plant *Luzula* (NORDENSKIÖLD, 1951) which again has a diffuse kinetochore.

If the hypothesis of "chromatid autonomy" thus helps us out of a difficulty in accounting for the occurrence of multiple chromosome numbers, it must not be assumed that older hypotheses are thereby eliminated with one stroke. The possibility of a polyploid origin in certain cases must still be kept in mind, and some cases — as for instance the origin of compound sex chromosomes in some *Hemiptera* — still find their most ready explanation in a "transverse break" process. Further, it goes without saying that duplication, non-disjunction, translocations, and deletion may occur whether a chromosome number is doubled or not.

3. DNA and Chromosome Structure

In view of the increasing amount of evidence that deoxyribose nucleic acid is intimately linked with the gene or with genic action, the amounts of this important constituent that are present in the chromosomes of various species, are of considerable interest.

On this basis of interrelation between the gene and DNA it may not seem surprising that the six species of *Thyanta*, which are phenotypically very similar, should show so little difference in their nuclear DNA content. But, as a matter of fact, the phenotype of an animal does not provide a very safe basis for hypotheses involving DNA. Thus HUGHES-SCHRADER (1951 and 1953) has shown that neither the phenotype nor the cytological aspects in various species of the mantid *Liturgousa* are closely correlated with DNA quantity, and this in face of the fact that it would be difficult to select a group of species that in outward appearance are more alike than the *Liturgousa* species.

Findings such as these pose some basic questions. MIRSKY and RIS (1951) were confronted with similar issues when they found that the amount of DNA carried in the erythrocytes of the amphibian *Amphiuma* is about 70 times as great as that of several species of birds, and 20 times that of the toad which is in the same Class of vertebrates. In contrast

to such huge differences that may exist between higher taxonomic groupings, their measurements of DNA in the erythrocytes of a long series of teleost fishes led them to the conclusion that the species within one Family are characterized by a relatively narrow range in the amounts of DNA.

Our own findings show that considerable differences may also be encountered within the Family, and the measurements in the cells of *Arvelius*, which has twice as much DNA as *Thyanta*, provide indubitable evidence that large differences may exist also between species of one Subfamily and even Tribe. Indeed HUGHES-SCHRADER's findings in *Liturgousa* demonstrate that differences of 50% may be present even between species of the same genus.

It is true that in the extreme cases of MIRSKY and RIS there are large systematic gaps between the animals involved. But they point out, quite rightly, that it would seem unlikely that an amphibian contains 70 times as many different genes as a bird. If, on a lower systematic level, the DNA differences are less extreme, it is nevertheless still unlikely that the bug *Arvelius* with a diploid number of 14 chromosomes should carry twice as many different genes as another member of the same tribe, *Thyanta*, which moreover has exactly the same chromosome number and general chromosomal configuration.

The almost unavoidable conclusion, reached by MIRSKY and RIS, and also by us, is that in the higher amounts of DNA we are dealing with a duplication or repetition of genes and not with the addition of new or different genes. If we accept the cytologist's concept of the chromosome as being composed of fine threads, possibly submicroscopic, in which the genes are carried, this would simply mean that each *Arvelius* chromosome contains about twice as many threads as the *Thyanta* chromosome. In cytological terminology this is to say that the degree of polyteny may be the primary basis for large differences of DNA. But this does not necessarily mean that a chromosomal complement of high DNA content is an exact multiple of one with a lower DNA value; it is conceivable that the chromosomes within one set differ in their grade of polyteny and, in any case, duplications, supernumeraries, and deletions would tend to alter any chromosomal complement in the course of time.

The implications of these conclusions must inescapably touch on fundamental questions concerning the structure and behavior of chromosomes. If the present concept of the chromosome is thereby complicated, it should be remembered that similar complications are already inherent in our ideas about the structure of salivary chromosomes, especially as they have recently been developed by BAUER and his students (see for instance BAUER and BEERMAN, 1952), as well as in the ramifications of endomitosis (cf. GEITLER, 1953).

Summary

1. The tropical species of the genus *Thyanta* conform, in their chromosome formula ($2n \delta = 12 + XY$, $2n \varphi = 12 + 2X$), to that which is typical for the Family of *Pentatomidae (Hemiptera)*, while the more northern species examined by us have either added a pair of chromosomes (*T. custator* and *T. pallidovirens*) or have doubled the basic number (*T. calceata*).

2. Hybrids between *T. custator* and *T. pallidovirens* show only minor disturbances in their meiosis, and the hybrid spermatids carry the same number of chromosomes and amount of DNA as are present in the spermatids of either parent species.

3. The meiosis of the hybrid between *T. calceata* and *T. pallidovirens* is quite abnormal and there is no chromosome pairing. Nevertheless, chromosome segregation is not completely at random and some functional sperms are formed.

4. The nuclei of the six species of *Thyanta* tested show little difference in their DNA contents. On the other hand, the nuclei of another pentatomid, *Arvelius*, contain at least twice as much DNA.

5. In considering the evolutionary origin of such a high chromosome number as that of *T. calceata*, the evidence adduced in the present investigation more or less precludes the involvement of polyploidy. Instead, some type of fragmentation was probably responsible for the doubled number.

6. It is difficult to conceive of such fragmentation as occurring transversely through the chromosomes. We propose a consideration of "longitudinal fragmentation" or better, a separation of the chromatids of each chromosome and the establishment of "chromatid autonomy".

7. Except where polyploidy is involved, great differences in the nuclear contents of DNA, as observed between some Classes and Orders, must in certain cases be due to different degrees of polyteny and not to the addition of new or different genes. Our evidence demonstrates that relatively large differences of DNA may also exist in systematic groups of a lower category, such as the Genera of the same Tribe, or perhaps even the Species of the same Genus. On this basis, the degree of polyteny may differ even in closely related forms.

References

ANSLEY, H. R.: A cytological and cytophotometric study of alternative pathways of meiosis in the house centipede (*Scutigera forceps* RAFINESQUE). *Chromosoma* **6**, 656-695 (1954). — BARBER, H. G.: The resurrection of *Thyanta calceata* SAY from synonymy. *J. N. Y. Entomol. Soc.* **19**, 108-111 (1911). — BAUER, H.: Karyologische Notizen I. Z. Naturforsch. **2b**, 63-66 (1947). — BAUER, H., u. W. BEERMANN: Die Polyténie der Kiesenchromosomen. *Chromosoma* **4**, 630-648 (1952). — BOWEN, R. H.: Notes on the occurrence of abnormal mitosis in spermatogenesis. *Biol. Bull.* **43**, 184-203 (1922a). — Studies on insect spermatogenesis II. *J. of Morph.* **37**, 81-193 (1922b). — DARLINGTON, C. D., and K. MATHER: The

elements of genetics. London: Allen a. Unwin 1949. — GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia*, Bd. VIC, S. 1—89. 1953. — HEIZER, P.: The chromosome cytology of two species of the Pacific genus *Oechalia* (*Pentatomidae, Hemiptera-Heteroptera*), *Oechalia patruelia* STAL and *Oechalia pacifica* STAL. *J. of Morph.* 87, 179—226 (1950). — HUGHES-SCHRADER, S.: Cytology of coccids (*Coccoidea-Homoptera*). *Adv. Genet.* 2, 127—203 (1948). — The desoxyribonucleic acid content of the nucleus as a cytological character in mantids (*Orthoptera: Mantoidea*). *Biol. Bull.* 100, 178—187 (1951). — The nuclear content of desoxyribonucleic acid and interspecific relationships in the mantid genus *Liturgousa* (*Orthoptera: Mantoidea*). *Chromosoma* 5, 544—554 (1953). — HUGHES-SCHRADER, S., and H. RIS: The diffuse spindle attachment of coccids, verified by the mitotic behavior of induced chromosome fragments. *J. of Exper. Zool.* 87, 429—456 (1941). — JENSEN-HAARUP, A. C.: On the genus *Thyanta*. *Entomol. Meddelser* 16, 183—291 (1928). — KIRKALDY, G. W.: Catalogue of the *Hemiptera* (*Heteroptera*) I. Berlin: Felix L. Dames 1909. — LORKEVIC, Z.: Die Chromosomenzahlen in der Spermatogenese der Tagfalter. *Chromosoma* 2, 155—191 (1941). — Chromosomen-Vervielfachung bei Schmetterlingen und ein neuer Fall fünffacher Zahl. *Rev. suisse Zool.* 56, 243—249 (1949). — McCLENTOCK, B.: The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. *Univ. Missouri Coll. Agri. Bull.* 290, 1—48 (1938). — The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 28, 458—463 (1939). — MICKEY, G. H.: Synapsis and behavior of chromosomes in polyploid male germ cells of *Romalea microptera* (BRAU). *Rec. Genet. Soc.* 13, 27—28 (abstract) (1944). — MIRSKY, A. E., and H. RIS: The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.* 34, 451—462 (1951). — MULLER, H. J.: Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Amer. Nat.* 59, 346—353 (1925). — NORDENSKIÖLD, H.: Cytotaxonomical studies in the genus *Luzula* I. *Hereditas* 37, 325—355 (1951). — RIS, H.: A cytological and experimental analysis of the meiotic behavior of the univalent X chromosome in the bearberry aphid *Tamalia (Phylaphis) coweni* (OKLL). *J. of Exper. Zool.* 90, 267—330 (1942). — RUCKES, H., and R. I. SAILER: The taxonomic status and distribution of *Thyanta custator* (FABR.) and *Thyanta pallidovirens* (STAL.). *American Mus. Novitates* (in press) 1956. — SCHRADER, F.: The chromosome cycle of *Protoronia primitiva* (Coccoidea) and a consideration of the meiotic division apparatus in the male. *Z. Zool.* 138, 386—408 (1931). — The elimination of chromosomes in the meiotic divisions of *Brachystethus rubromaculatus* DALLAS. *Biol. Bull.* 90, 19—31 (1946a). — Autosomal elimination and preferential segregation in the harlequin lobe of certain *Diiscocephalini* (Hemiptera). *Biol. Bull.* 90, 265—290 (1946b). — The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the *Heteroptera* and *Homoptera*. *Evolution* 1, 134—142 (1947). — TROEDSSON, P. H.: The behavior of the compound sex chromosomes in the females of certain *Hemiptera Heteroptera*. *J. of Morph.* 75, 103—147 (1944). — VANDEL, A.: Chromosome number, polyploidy, and sex in the animal kingdom. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 107, 520—541 (1938). — WARMKE, H. E., and A. F. BLAKESLEE: Sex mechanism in polyploids of *Melandrium*. *Science* 89, 391—392 (1939). — WESTERGAARD, M.: Studies on the cytology and sex determination in polyploid forms of *Melandrium album*. *Dansk. bot. Ark.* 10, 1—131 (1940). — WHITE, M. J. D.: The evidence against polyploidy in sexually reproducing animals. *Amer. Nat.* 80, 610—618 (1946). — Animal cytology and evolution, 2nd Ed. Cambridge: University Press 1954. — WILSON, E. B.: Polyploidy and metaphase patterns. *J. of Morph.* 53, 443—471 (1932).

Professor Dr. FRANZ SCHRADER, New York 27, N.Y., USA.,
Columbia University, Department of Zoology

Du Département d'Histologie et Embryologie. Faculté de Médecine Ribeirão Preto.
São Paulo, Brasil

L'ERREUR
DANS LA DÉTERMINATION HISTOPHOTOMÉTRIQUE
DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE
ET LA VARIATION INDIVIDUELLE DES NOYAUX
EN ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

Par

LUCIEN LISON et VICTORIO VALERI

(Eingegangen am 23. August 1955)

Introduction

La détermination histophotométrique de l'acide désoxyribonucléique (DNA), soit par la mesure de l'absorption ultraviolette, soit par la mesure de l'absorption de préparations traitées par la réaction de Feulgen, a fait actuellement l'objet de travaux déjà nombreux : entre autres BOVIN, VENDRELY et VENDRELY (1948); LISON et PASTEELS (1951); POLLISTER, SWIFT et ALFERT (1951); POLLISTER (1952 b); LEUCHTENBERGER, LEUCHTENBERGER, VENDRELY et VENDRELY (1952); PASTEELS et LISON (1953); LEUCHTENBERGER, HELWEG-LARSEN et MURMANIS (1954).

L'étude de ces travaux révèle que dans les tissus les plus divers, les mesures montrent une variation considérable de la teneur en DNA des noyaux *individuels*, même quand les résultats des auteurs tendent à démontrer la constance de la teneur *moyenne* des noyaux d'un même organisme. Il apparaît important de déterminer la signification exacte de ce fait. Une théorie sur laquelle l'on dispute actuellement beaucoup veut que la teneur en DNA des noyaux cellulaires soit constante pour toutes les cellules diploïdes d'un même individu. Les arguments pour ou contre cette théorie sont tous basés sur l'analyse chimique d'échantillons de tissus contenant un nombre connu de noyaux, ou sur la comparaison de *moyennes* de déterminations histophotométriques effectuées sur des populations de noyaux. Il est clair que toute conclusion basée sur ces prémisses ne peut être valide qu'au niveau du tissu ou de la population nucléaire, mais n'atteint pas le niveau de la cellule. Si même le problème de la constance de la teneur *moyenne* des noyaux en DNA était résolu définitivement, il laisserait entièrement ouvert celui de la constante de la teneur *individuelle* des noyaux. Ces deux problèmes sont très différents, et doivent être envisagés séparément, car leur signification n'est pas du tout identique. Qu'on nous permette une comparaison. Supposons démontré que la taille *moyenne* d'une population humaine constituée d'individus de même race, de même âge et de même

sexe, soit constante. On n'aurait pas démontré pour cela que la taille *individuelle* dans cette population est une constante; en fait, l'on sait bien que la taille individuelle présente une variabilité considérable. La constance de la taille est un caractère spécifique, mais pas un caractère individuel.

Plusieurs auteurs ont été frappés par les grands écarts que peuvent présenter les teneurs individuelles en DNA des noyaux d'un même tissu. Ainsi, LEUCHTENBERGER, SCHRADER, WEIR et GENTILE (1953) écrivent :

„The danger in relying too much on mean values alone is shown by our measurements of the DNA in skin nuclei (LEUCHTENBERGER and LUND 1952; LUND, LEUCHTENBERGER and GOLDSTEIN 1953). The mean of the latter corresponds very nicely to what one would expect from determining the DNA in the haploid sperms, but it actually masks an extraordinary amount of variation in the DNA content of the individual nuclei.”

D'autre part, POLLISTER (1952a) remarque :

“The highest value in a population of interphase nuclei is usually nearly 50% larger than the lowest. It is difficult to determine precisely what proportion of this variation is due to errors which are inherent in the cytological and photometric techniques, but it is possible that they may be far from adequate to account for a range of this magnitude. It is doubtful if any cytologist would feel justified at present in assuming that the cytological data exclude the possibility that within any tissue the actual DNA content of the nuclei may range as much as 15% above or below the mean.”

Le passage cité ci-dessus indique clairement une des données principales du problème: dans la grande variation observée, quelle est la part de l'erreur de mesure et quelle est la part de la variabilité propre du matériel?

En d'autres termes, quelle est l'importance relative du facteur *technique* et du facteur *biologique*?

A notre connaissance, la seule tentative de détermination objective de la précision des mesures histophotométriques est due à THOMSON et FRAZER (1954). Ces auteurs ont soumis à l'analyse de variance trois séries de mesures. L'une est constituée par un groupe de 24 noyaux de rein de Rat, mesurés chacun 4 fois: les deux autres par deux groupes de noyaux du foie du même animal, l'un de 36 noyaux, l'autre de 23 noyaux, mesurés chacun deux fois. L'analyse statistique montre sur ce matériel qu'il y a une différence significative entre les noyaux individuels. Par le calcul, les auteurs trouvent pour les estimées du coefficient de variation entre noyaux les valeurs, respectivement de 4,8 pour cent pour le rein, et de 11 et 18 pour cent pour le foie.

Les calculs de THOMSON et FRAZER sont basés sur un nombre restreint de mesures, et il paraît souhaitable de tenter une détermination plus précise de l'erreur expérimentale. Il est certes possible de faire une estimation de la précision des mesures sur des mesures en *duplicata*, mais comme on ne dispose que d'un seul degré de liberté par couple de

mesures pour l'élaboration statistique, il est évident qu'on ne peut prétendre à une exactitude très grande.

Dans ces dernières années, nous avons eu l'occasion de faire des mesures assez nombreuses sur les noyaux hépatiques du rat et une partie de notre matériel a fait l'objet de mesures histophotométriques comportant 10 lectures pour chaque noyau. C'est l'analyse de ce matériel que nous désirons présenter ici.

Matériel et techniques

Le matériel utilisé pour cette étude comprend 12 rats mâles, les uns normaux, les autres ayant subi soit l'hypophysectomie, soit une opération de contrôle («sham-operation»). Les foies de 10 animaux sur les 12 utilisés ont été fixés à l'alcool-formol-acide acétique 85 : 10 : 5, les deux autres respectivement à l'alcool-formol 90 : 10, et au formol salé tamponné à p_{H} 6,2 (mélange contenant: formaldéhyde 1,25 M, NaCl 0,1 M et tampon acide citrique-phosphate disodique 0,02 M).

Après 24 heures de fixation, les pièces ont été incluses à la paraffine, et débitées en coupes de 15 microns d'épaisseur. Les préparations ont été traitées par la réaction de Feulgen suivant les modalités techniques indiquées par LISON (1953), le temps d'hydrolyse étant de 12 minutes. Bien qu'accueillie dans des conditions semblables dans tous les cas, la technique de la réaction de Feulgen n'a pas été standardisée pour tous les animaux avec assez de rigueur pour que toute variation entre individus puisse être exclue. Le but de ce travail n'est pas de comparer les teneurs moyennes en DNA des individus entre eux, mais bien d'étudier la variabilité des noyaux d'un même individu. En conséquence, les légères fluctuations dues à la technique de la réaction, de même que les éventuelles variations de la teneur moyenne des individus dues au traitement opératoire¹ ne sont pas nuisibles pour le but que nous nous proposons.

Les mesures ont été effectuées au moyen de l'histophotomètre décrit par l'un de nous (LISON 1950), dans la bande de longueur d'onde de 535 $\text{m}\mu$, dans les conditions suivantes: objectif à immersion à fluorite Wild avec couche antiréflexion, grossissement propre 50 X, ouverte numérique 1,00; oculaire Wild 10 X avec couche antiréflexion; condensateur achromatique-aplanétique utilisé avec l'ouverture numérique 0,95; illumination de KÖHLER; diaphragme de champ ajusté de façon à limiter le champ éclairé de la préparation à 150 μ . L'effet Schwarzschild-Villiger (NAORA 1951, 1952) dans ces conditions n'étant pas supérieur à 2% n'a pas été corrigé, car, comme il a été démontré antérieurement (LISON 1953), il est négligeable dans la zone de transmission de 60%, moyenne des valeurs observées dans notre matériel.

Le grossissement total sur l'écran de l'histophotomètre a été de 2000 diamètres. Le diaphragme d'écran ayant 4 millimètres de diamètre, la portion mesurée de l'aire nucléaire correspond à un cercle de 2 μ de diamètre. Chaque cellule a fait l'objet de 10 déterminations successives. Chacune des lectures a comporté l'ensemble complet des manœuvres nécessitées par la technique histophotométrique, c'est-à-dire, dans l'ordre: 1. Fermeture du volet obturant la cellule photo-électrique. 2. Ajustement du «zéro» du microampèremètre. 3. Recherche d'un «blanc» en dehors du noyau à mesurer. 4. Ouverture du volet et ajustement de «100» de l'appareil (c'est-à-dire ajustement de l'aiguille du microampèremètre à la valeur «trans-

¹ Nous montrerons ailleurs que l'hypophysectomie cause une diminution significative de la teneur moyenne en DNA des cellules hépatiques du rat.

mission 100 %). 5. Déplacement de la préparation de façon à faire « tomber » le noyau à mesurer dans l'ouverture du diaphragme d'écran. 6. Lecture de la transmission. 7. Dessin du noyau étudié. Pour chaque lecture un « blanc » différent a été choisi, ce qui est facile, étant donné que n'importe quelle zone de la préparation alentour du noyau mesuré peut être utilisée. En outre, pour chaque lecture, une aire différente du noyau a été choisie, tout en restant dans une zone excluant le tiers externe de l'aire nucléaire. A cause de la forme sphérique du noyau, cette zone ne peut convenir pour les mesures, l'épaisseur de la couche absorbante y diminuant rapidement. Les noyaux mesurés ayant en moyenne 8μ de diamètre, la zone explorée est donc un cercle de 5μ environ de diamètre, ayant son centre au centre du noyau. L'opérateur a conduit les lectures successives de telle sorte que la position de l'aire explorée, de 2μ de diamètre comme nous l'avons dit, variât le plus possible à l'intérieur de cette aire.

La surface du noyau a été déterminée en planimétrant les dessins du noyau au moyen d'un planimètre à disque de précision, de marque Murbach. La planimétrie a été répétée deux fois pour chaque dessin et la moyenne des deux lectures a été adoptée. Étant donnée la haute précision de l'instrument utilisé (les planimètres à disque sont dix fois plus précis que les planimètres polaires courants), l'erreur commise dans la planimétrie est très petite en comparaison avec l'erreur que commet l'opérateur dans le dessin de l'objet et est donc négligeable.

Pour chaque répétition sur un même noyau, a été multiplié le log. de l'inverse de la transmission par la surface du dessin correspondant.

L'étude statistique des résultats a été faite par l'analyse de variance suivant les techniques de SNEDECOR (1946) et les valeurs critiques de F ont été obtenues par interpolation des tables du même auteur.

Résultats

Pour chacun des 12 animaux, les noyaux de 20 cellules hépatiques ont été étudiés, chacune des cellules ayant fait l'objet de 10 mesures complètes. Nous avons mesuré exclusivement les noyaux de la classe nucléaire II (tétraploïdes), qui ont été identifié par leur taille. L'on sait que le foie du rat présente de nombreuses cellules binucléées; seules les cellules uninucléées ont été étudiées dans les expériences présentes.

Chacun des animaux a d'abord fait l'objet d'une analyse de variance séparée, conduite de façon à isoler la variation due aux mesures, c'est-à-dire due aux facteurs techniques, de la variation entre noyaux différents.

Ces deux sources de variations sont indiquées dans les tableaux qui suivent sous les abréviations «erreur de mesure» et «noyau». Dans les calculs des composants de la variance, les variances relatives aux «mesures» et aux «noyaux» sont désignées respectivement par les symboles s_m^2 et s_n^2 .

Nous indiquons tout d'abord comme exemple le résultat de l'analyse de variance faite sur un animal.

L'examen du tableau ci-dessus révèle une différence statistiquement significative entre les noyaux individuels, la valeur critique de F pour le seuil de probabilité 1% étant très largement dépassée. Le coefficient entre les noyaux peut être estimé à 6,6%.

Il nous a paru intéressant de comparer ces résultats avec ce qu'auraient été ceux de mesures de DNA faites de la manière habituelle, c'est-à-dire sans faire des lectures multiples sur le même noyau.

Dans ce but nous avons calculé la moyenne, l'erreur-type et le coefficient de variation en utilisant seulement la première mesure effectuée pour chaque cellule, celle qui aurait été faite si l'on n'avait pas multiplié les lectures. D'après les 20 valeurs ainsi déterminées, nous avons calculé les paramètres suivants: Moyenne et erreur-type de la moyenne: $205,7 \pm 4,6$. Coefficient de variation: 10,0%. Comme nous l'indiquerons plus loin, le coefficient de variation ainsi trouvé est d'un ordre de grandeur comparable avec ceux d'autres auteurs.

Le tableau II indique les résultats des analyses de variance séparées pour les 12 animaux étudiés. Pour la commodité de la présentation, les données ont été ordonnées dans une forme différente de celle qui est généralement adoptée

Tableau 1. *Animal L4. DNA des noyaux hépatiques de la classe B. Analyse de variance. 20 noyaux mesurés 10 fois chacun*

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen
Noyaux	38.197	19	2.010
Erreur de mesure	33.775	180	188
Total	71.972	199	

$F = 10,7^{**}$. Valeur critique de F pour 19 et 180 degrés de liberté: $F, 0,05 = 1,6$, $F, 0,01 = 2,0$.

Calcul des composants de la variance:

$$s_n^2 = \frac{2.010 - 188}{10} = 182,2.$$

La moyenne des 20 noyaux est égale à 204,2. Par conséquent le coefficient de variation des noyaux est: $v_n = \frac{\sqrt{182,2}}{204,2} = 6,6\%$.

Tableau 2. *Analyses de variance séparées pour 12 animaux. Chaque animal 20 noyaux mesurés 10 fois chacun*

Animal	Carré moyen	Carré moyen de l'erreur de mesure	F	s_n^2	$v_n \%$	M
4 N	2.010	188	10,7 **	182	6,6	204
7 N	751	113	6,6 **	64	4,3	184
8 N	2.385	219	10,9 **	216	7,4	200
13 H	1.317	88	15,1 **	123	6,9	153
14 H	1.071	103	10,4 **	97	5,6	175
16 H	675	75	9,0 **	60	5,0	155
18 H	863	95	9,1 **	77	5,7	154
15 S	1.915	144	13,3 **	177	8,2	161
12 S	1.093	203	5,4 **	89	5,3	174
17 S	805	131	6,5 **	67	5,4	153
20 N	1.434	121	11,8 **	131	7,2	158
30 N	680	95	7,6 **	59	4,9	157

Animaux N normaux, H hypophysectomisés, S opérés contrôle.

Animaux Nr 4 à 17 fixés à l'alcool-formol-acétique; animal Nr 20 fixé à l'alcool formol. Animal Nr 30 fixé au formol salé tamponné à $p_{H_2} 3,6$.

Valeurs critiques de F : $F, 0,05 = 1,6$, $F, 0,01 = 2,0$.

s_n^2 = variance estimée pour les «noyaux». v_n coefficient de variation (%) estimé pour les «noyaux». M moyenne des résultats.

pour les tableaux d'analyse de variance. Comme nous avons mesuré chez tous les animaux le même nombre de cellules (20), avec chaque fois le même nombre de répétitions (10), il n'a pas été nécessaire de répéter le nombre de degrés de liberté, qui est identique à ceux indiqués dans le tableau I (19 pour les noyaux et 180 pour les mesures). Nous avons pas indiqué les valeurs des «sommes des carrés» que le lecteur pourra aisément recalculer à partir des valeurs des «carrés moyens».

Le tableau II montre clairement que *dans tous les cas*, l'analyse de variance démontre une différence statistiquement significative entre les noyaux d'un même individu, la valeur de F étant de loin supérieure à la valeur critique pour le seuil de probabilité de 1 %. Les valeurs des coefficients de variation v_n pour les noyaux oscillent entre 4,3 et 8,9. Il est intéressant de noter que ces coefficients de variation montrent une grande homogénéité, bien que les animaux étudiés diffèrent entre eux, soit par le traitement préliminaire administré à l'animal, soit par la fixation, et bien que les réactions de Feulgen n'aient pas été faites dans des conditions comparables. Les différences se marquent par des différences assez grandes dans la valeur *moyenne* de la teneur en DNA. Malgré cette circonstance, le coefficient de variations entre noyaux d'un même individu, ne varie que peu. L'erreur-type du coefficient de variation peut être calculée approximativement par la formule $s_n = v : \sqrt{2N}$; le nombre de noyaux pour chaque individu étant 20, la valeur de $\sqrt{2N}$ est de 6,3. Il est aisément vérifier par là que les valeurs du coefficient de variations ne présentent pas entre elles de différences statistiquement significatives. Ce fait paraît indiquer que *la cause de la variabilité des noyaux d'un même individu est indépendante du traitement effectué à l'animal, de la fixation et des variations dans la réaction de Feulgen*; cette conclusion n'est évidemment valable que dans les limites des conditions expérimentales adoptées.

Les indications relatives dans le paragraphe précédent nous ont incité à réunir toutes nos données dans une analyse de variance globale.

Celle-ci permet d'isoler, à partir des 2.400 mesures effectuées, la variation entre individus, la variations des noyaux d'un même individu et la variation des mesures faites sur un même noyau. Le tableau III donne les résultats de cette analyse et le calcul des estimées des composants de la variance.

L'analyse indique, encore une fois, une différence statistique hautement significative entre la teneur en DNA des noyaux d'un même individu. Le coefficient de variation pour les noyaux a été estimé, d'après les 2.400 mesures disponibles, à 7,6 %. Le lecteur ne s'étonnera pas de

voir le résultat global de l'estimation de coefficient de variation être supérieur à la moyenne des coefficients de variation individuels. Celle-ci, que l'on peut aisément calculer à partir des données du tableau II est en effet égale à 6,0%. Cette anomalie apparente s'explique comme suit: Comme le nombre de degrés de liberté dont on dispose pour les calculs est beaucoup plus grand, la précision s'en trouve augmentée et l'évaluation du résultat global indique une variation plus grande entre noyaux.

Dans un treizième animal, normal, fixé à l'alcool-formol-acide acétique, nous avons en répété 50 fois les mesures sur chaque noyau. Dix noyaux ont été étudiés. Le tableau IV indique l'analyse de variance correspondante.

Dans cet animal, où, à cause du grand nombre de mesures, la précision dans la détermination de la valeur de chaque noyau est assez grande (pour beaucoup de noyaux, l'erreur type de cette détermination est de l'ordre de 1%), il nous a paru intéressant d'indiquer isolément les valeurs trouvées pour chaque noyau, chacun avec son erreur-type (tableau V). Le lecteur verra facilement que ces valeurs montrent entre elles des différences hautement significatives.

Tableau 3. *Analyse de variance globale. Noyaux hépatiques classe B de 12 rats traités différemment*

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens
Individus	676,598	11	61,509
Noyau d'un même individu	401,500	228	1,760
Erreurs de mesure	284,760	2,160	131
Total	1.362,858	2,399	

$F_{n/e} = 1,760:131 = 13,4^{**}$; $F_{0,01} = 1,27$,
 $s_n^2 = \frac{1760-131}{10} = 163$; la moyenne générale étant $M = 169$, le coefficient de variation des noyaux est $v_n = \sqrt{\frac{163}{169}} = 7,6\%$.

Tableau 4. *Animal 9 N. DNA des noyaux hépatiques de la classe B. Analyse de variance. 10 noyaux mesurés chacun 50 fois*

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen
Noyaux	58,292	9	6,477
Erreur des mesures .	104,018	490	212
Total	162,311	499	

$F = 30,5^{**}$; F critique pour $P = 0,01: F = 2,5$; $s_n^2 = \frac{6,477-212}{50} = 125$. La moyenne étant $M = 194$, $v_n = \sqrt{125}: 194 = 5,8\%$.

Tableau 5. *Animal 9 N. DNA des noyaux hépatiques de la classe B. Valeurs moyennes des mesures effectuées sur 10 noyaux, 50 mesures par noyau*

Noyau No	$M \pm s_n$	Noyau No	$M \pm s_n$
1	194,2 \pm 2,4	6	188,6 \pm 1,8
2	193,6 \pm 1,8	7	187,6 \pm 2,2
3	205,2 \pm 2,7	8	195,6 \pm 2,4
4	217,6 \pm 2,1	9	197,3 \pm 2,1
5	187,6 \pm 1,8	10	175,5 \pm 2,1

Discussion

L'ensemble des résultats relatés plus haut permet la conclusion suivante: *Il y a des différences hautement significatives entre les noyaux cellulaires d'un même individu en ce qui concerne leur teneur en DNA déterminable par la réaction de Feulgen*, différences qui ne sont pas imputables à l'erreur inhérente à la technique. Nous avons trouvé pour l'estimée du coefficient de variation entre noyaux la valeur de 7,6%.

Cette valeur est inférieure à celle qui a été calculée par THOMSON et FRAZER (1954), qui est de 11%. Nous croyons que notre valeur, établie à partir de 2.400 mesures, a un poids beaucoup meilleur que celle de THOMSON et FRAZER, établie à partir de 46 mesures seulement. Quoi qu'il en soit, ceci ne change rien au reste de notre discussion.

Il nous paraît intéressant de chercher un point de comparaison afin d'établir la signification d'une variation correspondant à un coefficient de 7,6%. Dans ce but, nous reprendrons la comparaison avec la taille humaine, à laquelle nous avons fait allusion au début de ce travail. A partir d'un tableau établi par FISHER (1947) à partir de données concernant la taille de 1.165 hommes, l'auteur a calculé les valeurs suivantes: moyenne 68,64 pouces, écart type 2,70 pouces, — d'où nous pouvons calculer le coefficient de variation $v = 3,93\%$. De données citées par VAUGH (1947) concernant la taille de 1.000 étudiants de Harvard, on tire les valeurs suivants: moyenne 175,3 cm, variance 6,584, — d'où nous pouvons calculer le coefficient de variation $v = 3,76\%$. Enfin PEARL (1930) donne comme coefficient de variation de la taille humaine (mâle américain) la valeur $v = 3,60\%$.

En comparant ces valeurs avec celle que nous avons trouvée pour la variabilité de DNA nucléaire, nous arrivons à la conclusion que, d'après les estimations photométriques, *la variabilité des noyaux individuels en DNA est à peu près double de la variabilité des individus humains en ce qui concerne la taille*. Nous ne croyons pas que quelqu'un puisse raisonnablement affirmer que les individus humains sont de taille constante. Nous croyons donc que la conclusion, mainte fois exprimée, à la suite de travaux histophotométriques, que la teneur en DNA du noyau soit constante (en dehors de modifications du nombre de chromosomes) ne repose pas sur des bases suffisantes. THOMSON et FRAZER écrivent dans le sommaire de leur travail. „The coefficient of variation in DNA content between individual nuclei of the same class probably does not exceed 5—15 per cent. These observations are interpreted as supporting the view that in rat cell nuclei the DNA content per set of chromosomes is approximately constant”. Nous croyons que, pour être correcte, la dernière phrase devait dire: „These observations are interpreted as *not* supporting the view, etc.”.

Nous désirons définir clairement notre opinion afin qu'on ne se méprenne pas. Nous disons: les mesures histophotométriques ne sont pas en faveur de l'hypothèse de la constance du DNA par noyau individuel (en dehors des cas de polyploidie). Nous disons: les mesures histophotométriques ne démontrent pas, contrairement à ce que croient certains auteurs, la constance du DNA par noyau individuel. *Nous ne disons pas*: les mesures démontrent que la teneur en DNA des noyaux individuels n'est pas constante. Elles démontreraient que la teneur en DNA varie de noyau à noyau, *si l'on était certain que la répétition des mesures constitue une série non biaisée d'estimations du DNA*. En fait, l'on n'en est pas certain et voici pourquoi: La variance des mesures est constituée par la combinaison de divers facteurs dont les principaux sont: l'erreur instrumentale de lecture de la transmission, l'erreur instrumentale dans la détermination de la surface du noyau, les différences locales dans la répartition du DNA dans le noyau. Les deux premiers facteurs ne sont pas biaisés et la répétition des mesures permet d'en faire une analyse correcte. C'est le troisième facteur qui constitue la difficulté.

La répartition du matériel Feulgen-positif dans le noyau n'est pas homogène. Ce fait en soi ne constituerait pas un gros inconvénient, s'il était possible de multiplier les mesures *au hasard*. Cette dernière condition «au hasard», n'est pas remplie, car on ne peut étudier un noyau déterminé que dans une seule position, celle dans laquelle il se trouve dans le coupe. Par conséquent, il y a introduction d'un biais dans les déterminations. Il est fréquent par exemple de voir une plus grande concentration du DNA autour du nucléole («chromatine associée au nucléole»). Si le nucléole est situé dans le centre du noyau, il est pris systématiquement dans le champ exploré par l'instrument et les mesures donneront des valeurs moyennes trop élevées. S'il est situé dans la zone marginale, il échappe systématiquement aux mesures et celles-ci donneront des valeurs moyennes trop basses. S'il était possible de faire tourner le noyau dans la préparation, de sorte qu'il se présente au hasard suivant toutes les incidences possibles, alors la répétition des mesures conduirait à une valeur correcte. Malheureusement, cette condition n'est pas réalisable techniquement.

La discussion qui précède appelle les conclusions que voici:

1°. L'analyse statistique démontre qu'il existe des différences hautement significatives entre les noyaux individuels étudiés par histophotométrie, après traitement par la réaction de Feulgen.

2°. L'analyse statistique n'indique pas la nature de ces différences. Il est possible qu'elles soient dues à des différences réelles dans la teneur des noyaux en DNA, mais il est possible aussi qu'elles indiquent un biais des mesures, dû par exemple à des différences de position du noyau.

Il n'y a, ni dans notre travail actuel, ni dans ceux de nos prédecesseurs, aucune indication qui permette ni de confirmer ni de rejeter aucune de ces deux possibilités. La question de la constance ou de la non-constance du DNA dans le noyaux individuels d'un même tissu reste donc non résolue.

Il convient de remarquer, en terminant, que les investigations relatées dans le présent travail concernent uniquement les différences entre noyaux *individuels* d'un même tissu. Elle ne touchent pas au problème de la constance de la teneur *moyenne* en DNA des noyaux des différents tissus et n'apportent aucun document ni pour, ni contre l'hypothèse de cette constance.

Résumé et conclusions

1°. Les auteurs ont étudié par l'analyse de variance la teneur en DNA des noyaux individuels de la classe II du foie chez le rat, déterminée par l'histophotométrie sur des préparations histologiques traitées par la réaction de Feulgen. L'analyse de variance a été conduite de façon à séparer la variance due aux erreurs techniques de la variance due aux éventuelles différences réelles en DNA des noyaux.

2°. Cette investigation révèle des différences statistiquement très significatives entre les teneurs en DNA des noyaux d'un même individu. Le coefficient de variation entre noyaux, estimé d'après les données obtenues sur 2,400 mesures, est de 7,6%. Cette valeur est deux fois supérieure à la variation individuelle de la taille humaine.

3°. Ces résultats ne sont pas en faveur de l'hypothèse de la constance du DNA dans les noyaux *individuels*. Toutefois, ils ne prouvent pas définitivement l'hypothèse contraire, c'est-à-dire la non-constance du DNA. En effet, il n'a pas été possible de prouver, dans le présent travail, que la répétition des mesures sur un même noyau constitue une technique d'échantillonage statistique non biaisée. Par conséquent, on n'a pas obtenu la certitude que la variabilité observée — dont la réalité ne peut être niée — est due réellement à une variabilité du DNA.

4°. Les conclusions précédentes sont valides seulement en ce qui concerne la teneur *individuelle* des noyaux en DNA et ne touchent pas au problème de la constance ou de la non-constance de la teneur *moyenne* des noyaux en DNA. Sur ce point, le présent travail n'apporte aucun document nouveau.

Bibliographie

BOIVIN, A., R. VENDRELY et C. VENDRELY: L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *C. r. Acad. Sci. Paris* **226**, 1061—1063 (1948). — FISHER, R. A., and F. GATES: Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Edinburgh: Oliver & Boyd 1947. — LEUCHTENBERGER, C., H. HELWEG-LARSEN and L. MURMANIS: Relationship between hereditary pituitary dwarfism and the formation of multiple desoxyribose nucleic acid (DNA) classes in Mice. *Lab. Invest.* **8**, 245—260

(1954). — LEUCHTENBERGER, C., R. LEUCHTENBERGER, G. VENDRELY and R. VENDRELY: The quantitative estimation of deoxyribose nucleic acid (DNA) in isolated individual animal nuclei by CASPERSON's ultraviolet method. *Exper. Cell Res.* **3**, 240—244 (1952). — LEUCHTENBERGER, C., and H. Z. LUND: A cytochemical study of DNA in senile keratosis. *Cancer Res.* **12**, 278 (1952). — LEUCHTENBERGER, C., F. SCHRADER, D. R. WEIR and D. P. GENTIL: The deoxyribonucleic acid (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males. *Chromosoma* **6**, 61—78 (1953). — LISON, L.: Étude et réalisation d'un photomètre à l'usage histologique. *Acta Anat.* **10**, 333—347 (1950). — Schwarzschild-Villiger effect in microspectrophotometry. *Science* **118**, 383 (1953). — Histochemistry and Cytochemistry Animales. Principes et Méthodes. Paris: Gauthier-Villars Editeurs 1953. — LISON, L., et J. PASTEELS: Études histophotométriques sur la teneur en acide désoxyribonucléique des noyaux au cours du développement embryonnaire chez l'Oursin (*Paracentrotus lividus*), avec un appendice par L. MARTIN. *Arch. de Biol.* **62**, 1—64 (1951). — LUND, H. Z., C. LEUCHTENBERGER and M. GOLDSTEIN (1953), cité par LEUCHTENBERGER, C., F. SCHRADER, D. R. WEIR and D. P. GENTILE: *Chromosoma* **6**, 61—78 (1953). — NAORA, H.: Schwarzschild-Villiger effect in microspectrophotometry. *Science* **115**, 248—249 (1952). — NAORA, H., H. MATSUDA, M. FUKUDA and A. SIBATANI: Fundamental studies on the determination of deoxyribonucleic acid content of cell nuclei by means of microspectrophotometry. *J. Jap. Chem.* **5**, 729—732 (1931). — PASTEELS, J., et L. LISON: Sur la teneur en acide désoxyribonucléique des noyaux hépatiques chez le Rat. *C. r. Acad. Sci. Paris* **236**, 236—238 (1953). — PEARL, R.: Medical Biometry and Statistics, 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1930. — POLLISTER, A. W.: Nucleoproteins of the nucleus. *Exper. Cell Res.*, Suppl. **2**, 59—74 (1952a). — Microspectrophotometry of fixed cells by visible light. *Lab. Invest.* **1**, 231—249 (1952b). — POLLISTER, A. W., H. SWIFT and M. ALFERT: Studies on the desoxypentose nucleic acid content of animal nuclei. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **38**, Suppl. **1**, 101—120 (1951). — SNEDECOR, G. W.: Statistical Methods. Iowa State College Press 1946. — THOMSON, R. Y., and S. C. FRAZER: The deoxyribonucleic acid content of individual rat cell nuclei. *Exper. Cell Res.* **6**, 387—383 (1954). — WAUGH, A. E.: Elements of Statistical Methods. Connecticut State College, Storrs, 1947.

Prof. Dr. L. LISON, Departamento de Histologia e Embriologia,
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Brasilien.

Aus dem Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abteilung H. BAUER,
Wilhelmshaven, und dem Zoologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. H. AUTRUM)

DIE OOGENESE DER TIPULIDEN*

Von

KLAUS BAYREUTHER**

Mit 25 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. August 1955)

	Seite
A. Einleitung	509
B. Material und Methoden	509
C. Oogonienteilungen und Nukleinkörper	510
I. Allgemeines	510
II. Entstehung und Verteilung der Nukleinkörper in den sekundären Oogonen	512
a) Arten mit konstant 2 NK-Zellen	512
1. <i>Tipula lateralis</i> (als ausführlich besprochenes Beispiel)	512
2. Weitere NK-Zellen-konstante Arten mit $n = 3 + X$	515
3. NK-Zellen-konstante Arten ohne Geschlechtschromosomen	517
b) Sekundäre Nukleinkörper bei <i>Tipula oleracea</i>	519
c) Arten mit variabler Anzahl von NK-Zellen	521
D. Die Chromosomen und Nukleinkörper während der 1. und 2. Wachstumsperiode der Oocyten	522
E. Die Reifeteilungen im Ei	527
I. Allgemeines	527
II. Der Ablauf der Reifeteilungen und das Chromosomenverhälten	528
a) Arten mit achiasmatischer Paarung der Geschlechtschromosomen (<i>Pales crocata</i> und <i>Pales pratensis</i>)	528
b) Arten ohne Paarung der Geschlechtschromosomen (<i>Tipula lateralis</i> , <i>Tipula oleracea</i> , <i>Tipula paludosa</i>)	533
c) Arten ohne Geschlechtschromosomen (<i>Tipula caesia</i>)	540
III. Die Formveränderungen der Spindel während der Reifeteilungen	543
a) Allgemeines	543
b) Die Spindelveränderungen der einzelnen Arten	543
F. Diskussion der Ergebnisse	547
I. Die Nukleinkörper	547
II. Die Meiose	551
a) Die Chromosomen	551
b) Die Spindel	553
Zusammenfassung	554
Literatur	556

* Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Würzburg.

** Mit Unterstützung der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

A. Einleitung

Die Kenntnisse über das Verhalten der Chromosomen in der Meiose sind bei den Dipteren auf die Spermatogenese beschränkt. Unvollständige Darstellungen der Reifeteilungen im Ei liegen nur für eine kleine Anzahl Arten vor. Diese wenigen Untersuchungen stammen teilweise aus Zeiten, als die Bedeutung der Chromosomen noch nicht bekannt war, so daß das Interesse der Autoren anderen Fragen galt. Andererseits sind sie an genetisch bekannten Objekten (*Drosophila*) ausgeführt worden, um die Parallelität zwischen genetischem Faktorenaustausch und dem Auftreten von Chiasmen aufzuzeigen, doch sind diese Species wegen der geringen Größe ihrer Chromosomen für eine genauere cytologische Analyse ungeeignet.

Daher erschien eine cytologische Untersuchung der Oogenese bei den Dipteren wünschenswert, die an einigen Arten der Familie Tipulidae ausgeführt wurde. Diese sind wegen der Größe der Chromosomen dafür geeignet und zum Vergleich liegen für sie ausführliche Untersuchungen der Spermatogenese vor (BAUER 1931, 1956).

Danach gehört die Meiose im ♂♂ verschiedenen Typen an; Arten mit chiasmatischer und achiasmatischer Meiose treten nebeneinander auf, so daß außer einer allgemeinen Beschreibung der Chromosomenverhältnisse in den Reifeteilungen der Oocyten die Klärung der Frage nach dem Paarungsmodus der Chromosomen in der ♀♀-Meiose wichtig war.

Im Laufe der Untersuchungen wurden in den Teilungen der sekundären Oogenen extrachromosomal feulgenpositive Körper gefunden. Ihr Aufbau und Zerfall wird als morphologische Grundlage für zukünftige cytochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel der extrachromosomal Desoxyribosenukleinsäure beschrieben. Die Schwankungen der DNS-Menge in den diploiden Oogenen, die mit der Synthese und dem Abbau der extrachromosomal feulgenpositiven Körper einhergehen, werden unter dem Gesichtspunkt der DNS-Mengenkonstanz in Zellen gleichen Ploidiegrades diskutiert.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Meeresbiologie in Wilhelmshaven ausgeführt. Für die Anregung zu dieser Arbeit und vielseitige Förderung danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. H. BAUER, für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit Herrn Prof. Dr. H. AUTRUM.

B. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an folgenden Arten der Familie *Tipulidae*, Unterfamilie *Tipulinae*, vorgenommen¹:

1. <i>Pales crocata</i> L.	5. <i>Tipula (Tipula) paludosa</i> MEIG.	} <i>oleracea</i> -
2. <i>Pales pratensis</i> L.	6. <i>Tipula (Tipula) oleracea</i> MEIG.	
3. <i>Pales scurra</i> MEIG.	7. <i>Tipula (Tipula) pruinosa</i> WIEDEM.	} <i>pruinosa</i> -
4. <i>Pales quadrifasciata</i> SCHUMM.	8. <i>Tipula (Tipula) caesia</i> SCHUMM.	
	9. <i>Tipula (Tipula) marginata</i> MEIG.	
	10. <i>Tipula (Yamatotipula) lateralis</i> MEIG.	Gruppe

¹ Benennung nach MANNHEIMS (1951, 1952).

Die Larven, Puppen und ♀♀-Imagines entstammen teilweise den Institutszuchten, teilweise wurden ♀♀ eingefangen. Von den mit Nr. 1, 6, 8, 10 bezifferten Arten wurden die Oogonienteilungen und Reifeteilungen im Ei, bei den mit Nr. 3, 4, 7, 9 bezeichneten Arten nur die Oogonienteilungen, bei Nr. 2, 5 nur die 1. Reifeteilung untersucht.

Die Teilungen der primären Oogonien laufen bei allen Arten am Ende des 3. Larvenstadiums ab, die der sekundären Oogonien sind im mittleren 4. Larvenstadium abgeschlossen. Die 1. Wachstumsphase, in der die Zellen der Eianlagen gleichmäßig größer werden, dauert bis zum Ende des 4. Larvenstadiums. Danach tritt eine der 16 Zellen des Einährzcellverbandes, die definitive Oocyte, in die 2. Wachstumsperiode ein, die nach starker Vergrößerung und Dotterbildung mit der Ausbildung des Chorions am vorletzten Puppenstag beendet ist. Das Chorion ist sehr dick — z. B. bei *Tipula caesia* 12 μ — und bei einigen Arten im Augenblick des Schlüpfens der ♀♀-Imagines, bei anderen einen Tag danach, schwarz pigmentiert. Die Eier sind bei der Ablage — artspezifisch verschieden — 0,6—0,8 mm lang und 0,2—0,3 mm breit.

Die herauspräparierten Gonaden der Larven des 3. und 4. Stadiums wurden meistens mit Alkohol-Eisessig (AE) 3:1 fixiert und in Karminessäure (KE) gefärbt, kurz in 45% Essigsäure differenziert und in Euparal überführt. Zur Verdeutlichung schlecht färbbarer Strukturen wurden die Gonaden in KE vorgefärbt und in Orcein-Essigsäure-Milchsäure (OEM) gequetscht. Zur Klärung der Lagebeziehungen der Zellen waren Schnitträpparate notwendig. Gonaden von Larven und Puppen wurden in Bouin-Allen fixiert und 8—10 μ dick geschnitten und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain und nach der Feulgen-Methode gefärbt.

Die reifen ♀♀-Imagines von *Tipula lateralis*, *T. oleracea* und *T. paludosa* können durch Dekapitation zur beschleunigten Eiablage gebracht werden. Während die Ablage dieser Arten normalerweise mehrere Stunden dauert, legen die dekapitierten Tiere in 20—30 min ab. Dieses Verfahren versagte bei *Pales crocata*, *P. pratensis* und *Tipula caesia*. Dekapitierte Imagines dieser Arten sterben nach Ablage einiger Eier innerhalb kurzer Zeit. Hier kann die Eiablage in nassen Zellstoff durch leichten Drücken des Abdomens mit der Pinzette ausgelöst und beschleunigt werden. Um den Ablauf der Meiose zu verfolgen, wurden die in einem Zeitintervall von 5 min abgelegten Eier gesammelt und jeweils 5, 10, 15, . . . min nach der Ablage fixiert. Unter einer großen Anzahl Fixiermittel, die ausprobiert wurden, erwies sich nur Bouin-Allen als geeignet. Die Eier wurden ohne Anstich 10 min in 60° warmem und 36 Std in normal temperiertem Bouin-Allen fixiert; danach wurde das Chorion nach dem von SLIFER (1945) angegebenen Verfahren entfernt¹. Dafür wurden die Eier aus dem Fixiergemisch in eine frische Natriumhypochloritlösung mit ungefähr 4% aktivem Chlor (E. Merck, Darmstadt) übertragen, durch dessen oxydierende Wirkung das Chorion gleichmäßig dünner wird. Nach 10—20 min schimmern die durch die Fixierflüssigkeit gelb gefärbten Dotterschollen an den Längsseiten des Eies durch, während die beiden stärker chitinisierten Eipole noch dunkelbraune Färbung haben. Auf diesem Stadium wird die Behandlung durch Übertragen der Eier in 70% Alkohol unterbrochen, worin sie für 2 Std gelassen werden. Die Einbettung erfolgt über Butylalkohol und Benzol in Paraffin. Es wurden nur Querschnitte angefertigt, die Schnittdicke betrug 12 μ . Gefärbt wurde mit der Feulgen-Methode; Hydrolysedauer 22 min.

C. Oogonienteilungen und Nukleinkörper

I. Allgemeines

Ausführliche Beschreibungen der Oogonienteilungen und der Eibildung sind für *Tipula paludosa* vorhanden (BAUER 1931, 1932, 1933), mit

¹ Für den Hinweis auf diese Methode danke ich Herrn Prof. Dr. B. GLASS.

denen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen an weiteren Arten der Familie *Tipulidae* weitgehend übereinstimmen. Doch sind auch Unterschiede bei den verschiedenen Arten vorhanden; z. B. im Aufbau der Interphasekerne. Daneben sind die einzelnen Arten vor allen Dingen durch Besonderheiten im Verhalten und Aufbau extrachromosomaler feulgenpositiver Körper während der Teilungen der sekundären Oogonien charakterisiert. Diese Körper geben normale Feulgen-Reaktion, unabhängig von der Art der Fixierung, nach jeweils optimaler Hydrolysedauer. Sie enthalten also Desoxyribosenukleinsäure. *Derartige extrachromosomal feulgenpositive Körper werden kurz Nukleinkörper (NK) genannt* (BAYREUTHER 1952).

Die NK treten bei allen Arten — außer *Tipula oleracea* und *Pales crocata*, bei denen sie bereits in der 1. Teilung der sekundären Oogonien vereinzelt zu finden sind — zum 1. Mal in der Prophase des 2. Teilungsschrittes der sekundären Oogonien, jeweils in beiden Schwesterzellen, auf. Sie werden in den folgenden 3 Teilungsschritten immer nur in einen der beiden Tochterkerne einbezogen und in doppelter Linie an 2 der 16 Zellen einer Eianlage weitergegeben (BAYREUTHER 1952, BAUER 1953). Tabelle 1 gibt für 7 Arten die Anzahl der ausgewerteten

Tabelle 1. Ausgewertete Mitosen und Ovarien bei den Arten mit konstant 2 NK-Zellen

Arten	Differentialmitose			Gesamtzahl der analysierten Differentialmitosen	Zahl der ausgewerteten Ovarien	Abweichungen von der Zahlenkonstanz
	2.	3.	4.			
<i>T. lateralis</i>	33	21	27	81	54	0
<i>T. marginata</i>	8	13	11	32	26	0
<i>P. quadrifasciata</i> . . .	7	9	13	29	24	0
<i>P. scurra</i>	4	12	7	23	17	0
<i>T. caesia</i>	12	14	18	44	18	0
<i>T. pruinosa</i>	5	7	14	26	13	0
<i>T. oleracea</i>	11	13	16	40	24	0

Gruppenmitosen der einzelnen Teilungsschritte, weiterhin die Gesamtzahl der analysierten Gruppenmitosen und die Anzahl der ausgewerteten Ovarien wieder.

Danach sind im 2., 3. und 4. Teilungsschritt bei allen 7 Arten ausnahmslos 2 Zellen mit NK vorhanden, so daß die Species unter diesem Gesichtspunkt zu einer Gruppe zusammengefaßt werden können (Arten mit konstant 2 NK-Zellen).

Bei einer weiteren Art, *Pales crocata*, ist die Zahl der NK-bildenden Zellen nicht streng determiniert, so daß schließlich NK in 1—4 Zellen der 16zelligen Eianlagen gelangen (Arten mit variabler Anzahl von NK-Zellen). Hierher gehört vielleicht auch *Tipula paludosa*.

II. Entstehung und Verteilung der Nukleinkörper in den sekundären Oogonien

a) Arten mit konstant 2 NK-Zellen

1. *Tipula lateralis* (als ausführlich besprochenes Beispiel). Diese Art hat einen Chromosomenbestand von $n = 3 + X(Y)$ (Abb. 1e). Die drei Autosomen haben ungefähr gleiche Länge und mediane Kinetochore.

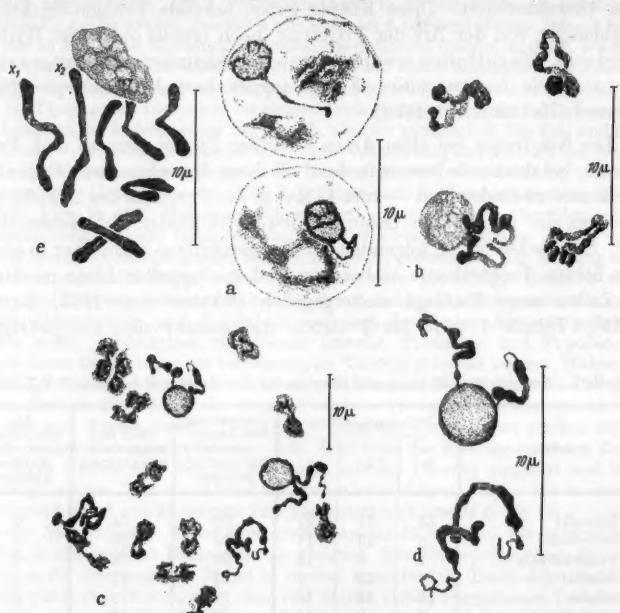


Abb. 1a—e. *Tipula lateralis*. Nukleinkörperaufbau. a Späte Interphase (Schollenstadium) vor dem 2. Teilungsschritt, Aufbau der Nukleinkörper an den Enden der entspiralisierten Heterosomen. b Prophase des 2. Teilungsschrittes, Geschlechtschromosomen haben nur noch terminale Bindung an den Nukleinkörper. c Späte Interphase vor dem 3. Teilungsschritt, 2 Heterosomenpaare mit, 3 ohne Nukleinkörper. d Heterosomen mit und ohne Nukleinkörper aus c herausgezeichnet. e Metaphase des 2. Teilungsschrittes mit Nukleinkörper, X_1 und X_2 , Geschlechtschromosomen. a Schnitt, Heidenhain. b, c, d, e KE, OEM. a Vergr. 2300. b, e Vergr. 2500. c Vergr. 1200. d Vergr. 3000

Das submediokinetische X-Chromosom ist das längste Element des Chromosomensatzes, seine Schenkellängen stehen ungefähr im Verhältnis 1:2. Die Geschlechtschromosomen sind total heterochromatisch.

Die 1. Teilung der sekundären Oogonien verläuft ohne Besonderheiten. In den beiden Ruhekernen bilden die Chromosomen zunächst ein typisches reticuläres Interphasestadium (1. Interphasestadium, Abb. 2f) und gehen danach in das längerwährende Schollenstadium

(2. Interphasestadium, Abb. 2g, h) über. Im Schollenstadium enthält jede sekundäre Oogonie 3 hantelförmige und eine unregelmäßig gestaltete Chromatinscholle (Abb. 2g, h).

In der Prophase des 2. Teilungsschrittes differenzieren sich aus diesen unregelmäßig gestalteten Schollen die beiden Geschlechtschromosomen als lange spiralförmig gewundene Fäden heraus (Abb. 2h), die einander an einem Ende regelmäßig stark genähert sind. Dieses Ende der X-Chromosomen ist dadurch charakterisiert, daß es einen kurzen, auffallend dünnen Terminalabschnitt besitzt. An diesen dünnen Terminalabschnitten tritt im weiteren Verlauf der frühen Prophase ein kleiner runder Körper feulgenpositiven Materials auf, der sich schnell vergrößert und dabei von den locker spiralierten Geschlechtschromosomen umwunden wird. Die Umschlingung ist in der Regel nur partiell, so daß dem feulgenpositiven Körper (NK) peripher 2 Chromosomenenden von wechselnder Länge anhaften (Abb. 1a). Mit zunehmender Größe wird an dem NK zunächst eine Randzone von stärkerer Feulgen-Reaktion erkennbar; dann erscheinen im zentralen Teil feulgenpositive Granula wechselnder Zahl und Größe, die schließlich zu einem Netzwerk feulgenpositiver Stränge zusammentreten. Nach diesem Differenzierungsprozeß geben die zwischen der Randzone und dem Netzwerk verbliebenen Vakuolen keine merkliche Feulgen-Reaktion mehr. Nach vollzogenem Aufbau des NK lösen sich die Geschlechtschromosomen bis auf terminalen Kontakt von ihm ab (Abb. 1b). Nun treten auch in den 3 Autosomenschollen Chromatinfäden hervor, deren Doppelnatür bald sichtbar wird. In der späten Prophase haben sich die Homologen ganz aus den Schollen herausdifferenziert und sind nur noch an terminalen Abschnitten gepaart (Abb. 1b); ihre Paarung ist in der Prometaphase vollständig gelöst.

In der Metaphase liegen die runden bis elliptischen NK in den beiden Zellen am Plattenrand, meist in Berührung mit dem langen Schenkel eines oder beider Geschlechtschromosomen (Abb. 3a).

Nach der Trennung der Chromatiden in der Anaphase haben sich in der Regel die Tochterhälften der X-Chromosomen einer der beiden Anaphasegruppen von dem NK gelöst (Abb. 2a). Von den anaphasischen Geschlechtschromosomen am anderen Pol wird er dann tropfenförmig ausgezogen, ohne zunächst seine ursprüngliche Lage in der Äquatorialebene aufzugeben (Abb. 2a). Ausnahmsweise kann der NK auch zwischen beiden Tochtergruppen ausgespannt werden (Abb. 2b); es wurden aber niemals Bilder gefunden, die auf eine Zweiteilung des NK in solchen Ausnahmefällen hindeuten, so daß es auch hier wohl schließlich zu einer Trennung von einer der beiden Anaphasehälften kommt. Hierfür spricht Abb. 2c, wo sich der NK gerade von der oberen Anaphasegruppe gelöst hat. Erst in der späten Anaphase ist eine unter Kontraktion ablaufende Verschiebung des NK zum Pol hin zu bemerken,

und in der Telophase liegen dann die NK regelmäßig einer Telophasegruppe in von Fall zu Fall wechselnder Anordnung dicht an (Abb. 2e). Die spätanaphasische Polwanderung der NK kann in seltenen Fällen auch ganz ohne Kontakt mit den X-Chromosomen stattfinden (Abb. 2d). Stets finden die Bewegungen der NK nur in den peripheren Spindel-

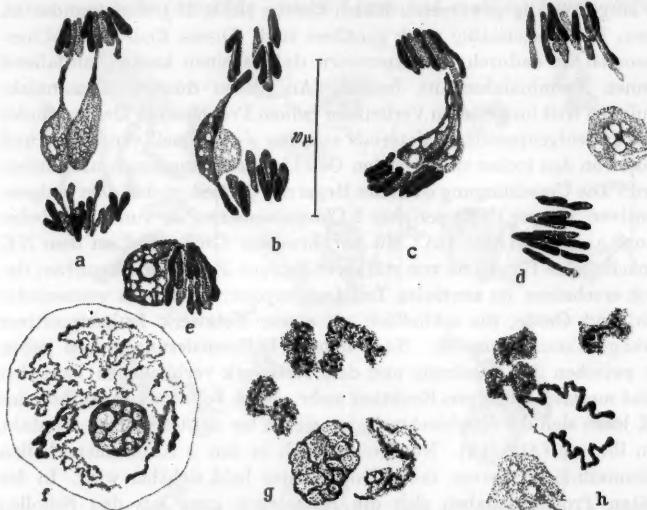


Abb. 2a-h. *Tipula lateralis*. Anaphasebewegung und Nukleinkörperabbau. a Nukleinkörper wandert in Verbindung mit den langen Schenkeln der Heterosomen. b Verspätetes Trennen des langen Schenkeln eines Geschlechtschromosoms, der Nukleinkörper liegt dem langen Schenkel an und wird zwischen den beiden Anaphasehälften ausgespannt. c Nukleinkörper zwischen den beiden Anaphasegruppen ausgespannt. d Nukleinkörper ohne Kontakt mit den Chromosomen. e Telophasegruppe mit anliegendem Nukleinkörper. f Nukleinkörper im retikulären Interphasenrüst eingebettet, beginnende Vakuolisierung. g Maximale Vakuolisierung im frühen Schollenstadium, die Heterosomenenscholle rechts neben dem Nukleinkörper. h Fortgeschrittenes Abbau des Nukleinkörpers. KE, OEM. Vergr. 2500

regionen statt. Die Zellen mit und ohne NK haben gleiche Größe, die Plasmateilung ist also quantitativ äqual.

Die NK werden in die Ruhekerne einbezogen. Im retikulären Interphasestadium treten in den zunächst noch kugeligen NK große Vakuolen auf. Dabei sind die Randschicht und das die Vakuolen gegeneinander abgrenzende Gerüstwerk noch kräftig ausgeprägt (Abb. 2f). Erst zu Beginn des Schollenstadiums (2. Stadium der Interphase) schwellen die randständigen Vakuolen so stark an, daß die NK Traubenform annehmen (Abb. 2g). Hierbei wird auch das den NK durchziehende feulgenpositive Gerüstwerk und seine Rinde zunehmend dünner und blasser. Kurz

vor seiner vollständigen Auflösung enthält der jetzt ganz schwach und diffus gefärbte NK nur noch einige zentrale Vakuolen (Abb. 2h); die peripheren Vakuolen müssen in der Zwischenzeit also aufgeplatzt bzw. aufgelöst worden sein.

Kurz vor dem Verschwinden des alten NK beginnen sich aus den unvollständig umgeformten Kernschollen der 4 Kerne die prophasisch spiralierten, ungepaarten X-Chromosomen herauszudifferenzieren (Abb. 2h), an ihren dünnen Enden (s. oben) treten, nachdem die alten NK völlig abgebaut sind, in 2 Zellen neue NK auf. Die Frage, ob die NK in denjenigen Interphasekernen neu aufgebaut werden, in die die NK der vorherigen Gruppenmitose aufgenommen wurden, kann also nicht direkt entschieden werden, sie wird in der Diskussion eingehend behandelt werden¹. Wie in der Prophase des 2. Teilungsschrittes umschlingen die X-Chromosomen wieder den heranwachsenden neuen NK, um sich nach seinem Aufbau bis auf terminale Bindungen von ihm zu lösen. In den beiden NK-freien Prophasekernen des 3. Teilungsschrittes bilden die X-Chromosomen zu dem Zeitpunkt, wo die Geschlechtschromosomen in den NK-Zellen die heranwachsenden NK umschlingen, ein dichtes Knäuel, dem ein kleiner Nukleolus anliegt; auch der weitere Formwechsel der X-Chromosomen in den nicht NK-haltigen Kernen verläuft synchron mit ihren prophasischen Veränderungen in den NK-Zellen (Abb. 1c, d).

In der Metaphase des 3. Teilungsschrittes enthalten 2 der 4 Platten, in der Anaphase 2 der 8 Anaphasegruppen je einen NK (Abb. 3c). Für ihren Abbau und für den Aufbau der neuen NK des 4. Teilungsschrittes gelten die bereits besprochenen Gesetzmäßigkeiten. Nach Ablauf der 4. Teilungsschritte liegt dann ein Verband aus 16 Zellen vor, von denen 2 einen NK zugeteilt bekommen haben (Abb. 3d).

Die beiden Spindeln, in denen die NK des 2., 3. und 4. Teilungsschrittes auftreten, sind stets benachbart (Abb. 3c, d), und ihre Längsachsen laufen mehr oder weniger parallel zueinander (Abb. 3b, c, d). Außerdem wandern die NK in den beiden Spindeln stets gleichgerichtet (Abb. 3b, c, d).

2. Weitere NK-Zellen-konstante Arten mit $n = 3 + X$. Hierher gehören *Tipula marginata*, *Pales scurra* und *P. quadrifasciata*²; alle 3 Species weisen den Chromosomenbestand von $n = 3 + X (Y)$ auf (Abb. 4a, b, c), wobei die subtelokinetischen X-Chromosomen bei *T. marginata* die längsten Elemente des Chromosomenbestandes darstellen (Abb. 4a, X_1, X_2), während die X-Chromosomen der beiden *Pales*-Arten verhältnismäßig

¹ Versuche, diese Frage durch Lebendbeobachtungen zu klären, hatten keinen Erfolg. Die Zellen sterben nach spätestens 30 min ab, da der Druck, der notwendig ist, um das die Zellen einer Gruppenmitose umgebende Follikelepithel zu sprengen, sehr groß ist und die Zellen stark schädigt.

² *Tipula oleracea* wird gesondert besprochen (s. S. 519).

kurz sind. Entsprechend der Länge der heterochromatischen X-Chromosomen, die auch hier als Bildungsorte fungieren, hat *T. marginata*

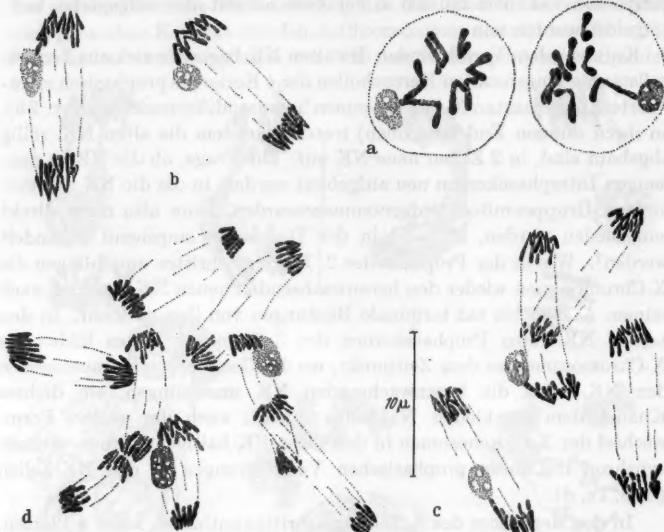


Abb. 3a-d. *Tipula lateralis*. Gruppenmitosen der sekundären Oogonien mit Nukleinkörpern. a Metaphase, b Anaphase des 2. Teilungsschrittes, c Anaphase des 3. Teilungsschrittes, d Anaphase des 4. Teilungsschrittes. a Polansicht. b, c, d in Seitenansicht. Schnitt, Hidenhain. Vergr. 2300

sehr große, die beiden *Pales*-Arten kleinere NK, die morphologisch übereinstimmen und entsprechend der gleichen Länge der X-Chromosomen beider Arten (Abb. 4b, c) in gleichen Teilungsschritten von gleicher



Abb. 4a-c. Primäre Oogonienmetaphasen von a *Tipula marginata*, X_1 und X_2 , Geschlechtschromosomen. b *Pales scura*. c *Pales quadristrigata*. Schnitt, Hidenhain. Vergr. 2300

Größe sind. Auf- und Abbau der NK dieser 3 Arten folgen den bei *T. lateralis* aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten; Unterschiede sind nur in ihrem Verhalten während der Polbewegung vorhanden: so hängen die großen NK bei *T. marginata* den langen Schenkeln der Geschlechts-

chromosomen in der Anaphase der Teilungen der sekundären Oogonien an, während die NK der *Pales*-Arten stets ohne Kontakt wandern.

3. *NK-Zellen-konstante Arten ohne Geschlechtschromosomen.* *Tipula caesia* und *T. pruinosa* besitzen keine morphologisch differenzierten Geschlechtschromosomen; ihr Chromosomenbestand ist $n = 3$. Bei ihnen erfolgt die Synthese der extrachromosomalen feulgenpositiven Substanz an den heterochromatischen Regionen der Autosomen und die Zahl der jeweils in 2 Zellen des 2., 3. und 4. Teilungsschrittes auftretenden NK stimmt bei diesen beiden Arten mit der Anzahl der heteropyknotischen Regionen innerhalb des haploiden Chromosomenbestandes überein.

So weist *T. caesia* in jedem der 3 V-förmigen Chromosomen des haploiden Satzes eine heterochromatische Region auf, und dementsprechend treten auch in jeder der beiden NK-Zellen des 2., 3. und 4. Teilungsschrittes bis zu 3 NK auf.

In den beiden etwa gleichschenkligen Homologenpaaren — das Längenverhältnis der Schenkel ist 1:1,2 (Abb. 5c) — ist die Kinetochorenregion heterochromatisch (Abb. 5b). Das Heterochromatin erstreckt sich im längeren Schenkel ungefähr doppelt so weit, wie im kürzeren. Beim 3. Paar — seine Schenkel haben ein Längenverhältnis von 1:2 (Abb. 5c, unten rechts) — sind $\frac{3}{4}$ des kurzen Schenkels heterochromatisch (Abb. 5b). Die heterochromatischen Abschnitte bilden in der Interphase 3 Chromocentren, von denen die beiden der nahezu gleichschenkligen Chromosomenpaare langgestreckt und dünn sind und stets benachbart liegen, so daß die an ihnen in der frühen Prophase auftretenden feulgenpositiven Körper miteinander verschmelzen (Abb. 5b). Der 3. NK wird von den ungepaarten terminalen Abschnitten der heterochromatischen kurzen Schenkel des ungleichschenkligen Chromosomenpaars aufgebaut (Abb. 5b). Die NK hängen häufig bis zur späten Prometaphase mit dünnen Fäden an ihren Bildungsorten; diese Verbindungen sind in der Metaphase gelöst. Es treten dann in jeder NK-Zelle 3 rechteckig begrenzte bis birnenförmige NK auf (Abb. 5a), von denen allerdings 2, die NK der beiden nahezu gleichlangen Chromosomenpaare, meist hintereinander (Abb. 5c) oder nebeneinander (Abb. 5a) angeordnet und total oder partiell miteinander verschmolzen sind (Abb. 5a, c). Die NK wandern in der Anaphase ohne Verbindung mit Chromosomen (Abb. 5c, d), verklumpen in der späten Anaphase und liegen in der Telophase den Chromosomen als stark vakuolisierte Kappe an (Abb. 5f).

Wie ein Vergleich von Abb. 5c (2. Teilungsschritt) mit Abb. 5d (4. Teilungsschritt) erkennen läßt, werden die Chromosomen und auch die NK vom 2. zum 4. Teilungsschritt kleiner; die gleiche Größenreduktion konnte bei den anderen untersuchten Arten auch gefunden werden, doch ist sie bei *Tipula caesia* besonders stark ausgeprägt.

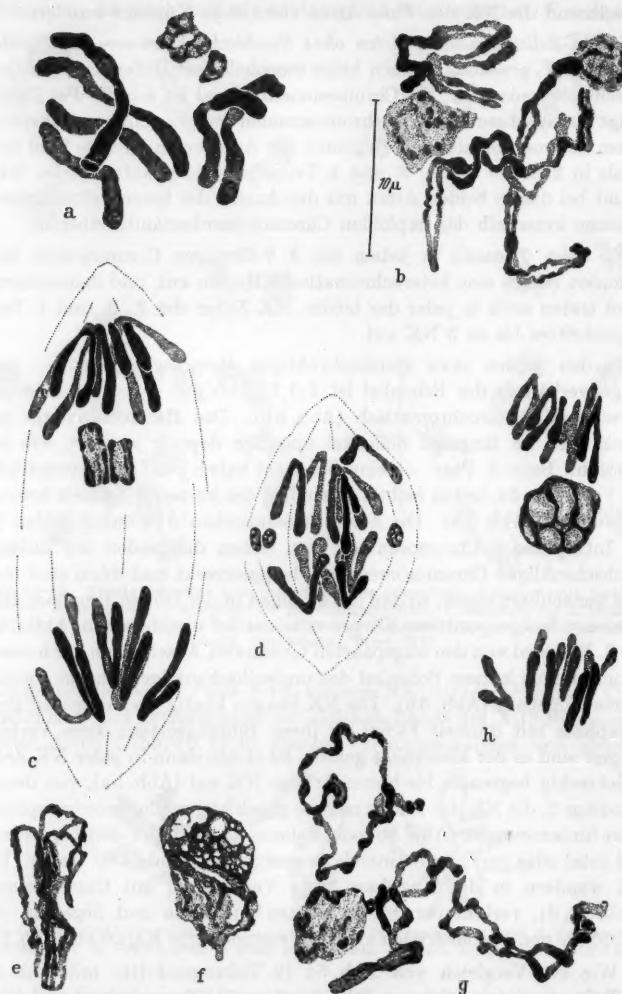


Abb. 5a—h. *Tipula caesia* und *Tipula pruinosa*. *Tipula caesia* a—f. a Metaphase des 2. Teilungsschrittes mit Nukleinkörpern. b Prophase des 2. Teilungsschrittes. c Anaphase des 2. Teilungsschrittes. d Anaphase des 4. Teilungsschrittes. e Telophasegruppe ohne, f mit Nukleinkörper. *Tipula pruinosa* g, h. g Prophase des 2. Teilungsschrittes. h Anaphase des 2. Teilungsschrittes. KE, OEM. Vergr. 2500

Bei *Tipula pruinosa* ist nur in einem der beiden kürzeren Autosomenpaare ein heterochromatischer Abschnitt vorhanden, an dem in der frühen Prophase des 2., 3. und 4. Teilungsschrittes in den beiden NK-Zellen ein NK auftritt (Abb. 5g), der mit großen Vakuolen angefüllt ist und in der Anaphase ohne Verbindung mit den Chromosomen einer Anaphasehälfte folgt (Abb. 5h). Die 3 Autosomenpaare von *T. pruinosa* sind submediokinetisch; ein Paar, in Abb. 5h rechts außen, ist etwas länger als die beiden anderen.

b) Sekundäre Nukleinkörper bei *Tipula oleracea*

Obgleich auch bei dieser Art die NK in einer doppelten Linie an 2 der 16 Zellen einer Eianlage weitergegeben werden, sind doch geringfügige Abweichungen vom Normalmodus der NK-Bildung und Verteilung bei *T. oleracea* vorhanden, die sie von den anderen Arten mit konstanter Zahl der NK-Zellen trennt und auf eine Entwicklungsstufe zwischen die Arten mit konstanter und variabler Zahl von NK-Zellen stellt.

Der Chromosomenbestand von *Tipula oleracea* ist $n=3+X(Y)$ (Abb. 6a). Aufklärung über die Chromosomenform gibt Abb. 6b, c.

Danach liegen 2 gleichlange, mediokinetische Chromosomenpaare vor, von denen 1 Paar in einem Schenkel eine Einschnürung von $1/8$ der Schenkelänge aufweist. Das 3. Paar ist submediokinetisch, die Schenkel haben ein Längenverhältnis von 1:1,5. Die Geschlechtschromosomen, als kürzeste Elemente des Satzes, sind subtelokinetisch und total heterochromatisch.

Bei dieser Art enthalten 10% der Zellen (6 von 62) bereits in der Metaphase des 1. Teilungsschrittes der sekundären Oogenen einen großen homogenen NK, der in der frühen Anaphase in eine variable Zahl kleiner NK zerfällt, die ungefähr mengengleich auf beide Anaphasehälfte verteilt werden (Abb. 6d) und in der kurzen reticulären Interphase abgebaut werden.

Im Schollenstadium vor dem 2. Teilungsschritt tritt dann in beiden Zellen der neue NK am rundlichen Chromocentrum, den X-Chromosomen, auf. Er ist zunächst klein und homogen; mit zunehmender Größe treten Granula verschiedener Gestalt in zunehmender Anzahl in ihm auf, die regellos in der schwach färbbaren Grundmasse eingebettet sind (Abb. 6e) und nur selten zu größeren Aggregaten oder Strängen verschmelzen. Ihre Einlagerung erfolgt gleichmäßig, eine Anreicherung in den dem Chromocentrum anliegenden Bereich kommt nicht vor. Der NK teilt sich beim Eintritt in die Metaphase des 2. Teilungsschrittes in eine variable Zahl kleiner NK auf (Abb. 6b); diese sind homogen und enthalten in der Metaphase nur noch wenige randständige Granula, aber

nie Vakuolen und folgen in der späten Anaphase ohne Kontakt mit den Geschlechtschromosomen sämtlich der gleichen Tochterplatte.

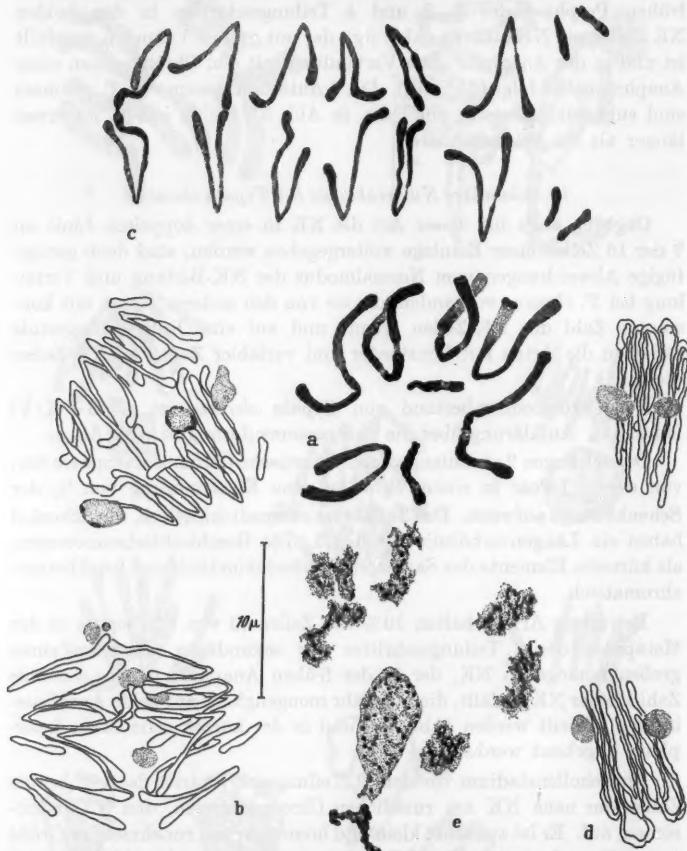


Abb. 6a-e. *Tipula oleracea*. a Metaphase einer sekundären Oogonie. b Anaphase des 2. Teilungsschrittes. c Chromosomen aus der oberen Anaphase von b herausgezeichnet, Homologe nebeneinander angeordnet. d Anaphase des 1. Teilungsschrittes mit Nukleinkörpern. e Schollenstadium, Nukleinkörper hat sich vom Chromocentrum abgelöst.
KE, OEM. Vergr. 2500

Im 3. und 4. Teilungsschritt sind die NK dagegen meistens als einzelne kompakte Körper in 2 Metaphasen vorhanden und folgen ungeteilt 2 der 8 bzw. 16 Telophasehälften.

Unabhängig von den beiden großen NK treten in ungefähr 50 % der Gruppenmitosen des 4. Teilungsschrittes in einer variablen Zahl der

6 anderen Anaphasen sekundäre kleine NK auf (Abb. 7). Ihre Entstehung ist ungeklärt, doch liegt die Vermutung nahe, daß sie ebenfalls von den heterochromatischen Geschlechtschromosomen aufgebaut

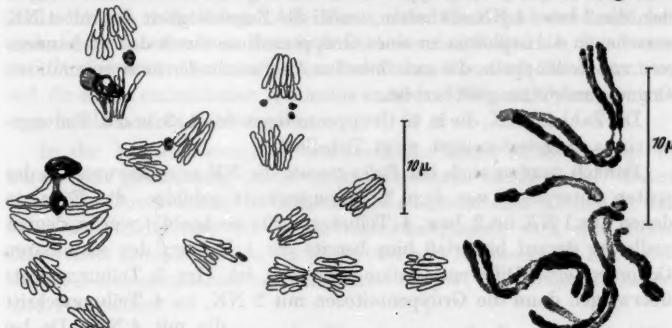


Abb. 7. *Tipula oleracea*. Ana-Telophase des 4. Teilungsschrittes, 2 Anaphasen mit großen, 3 weitere mit kleinen Nukleinkörpern. KR. Vergr. 1300

Abb. 8. *Pales crocata*. Prometaphase des 3. Teilungsschrittes. KR, OEM. Vergr. 2500

werden. In der Anaphase werden sie meistens auf beide Anaphase-hälften verteilt. Im gleichen Ovar kommen 16er Gruppen mit und ohne zusätzliche sekundäre NK vor.

c) Arten mit variabler Anzahl von NK-Zellen

Den 7 bisher beschriebenen Arten mit konstanter NK-Zahl steht *Pales crocata* gegenüber, bei der die NK-Bildung nicht streng deter-

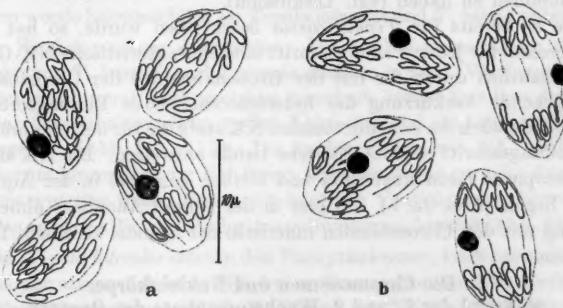


Abb. 9a u. b. *Pales crocata*. Anaphasen des 3. Teilungsschrittes aus dem gleichen Ovar mit a zwei, b vier Nukleinkörpern. Schnitt, Heidenhain. Vergr. 2000

minierte ist. Ihr Chromosomenbestand ist $n = 3 + X(Y)$. Die X-Chromosomen sind subtelokinetisch und total heterochromatisch; die 3 Autosomenpaare sind submediokinetisch (Abb. 8.)

Gruppenmitosen gleicher Teilungsschritte dieser Art weisen inter- und intraindividuelle Schwankungen der NK-Zahl auf. So stellen Abb. 9a, b 2 Anaphasegruppen des 3. Teilungsschrittes aus einem Ovar dar, die 2 bzw. 4 NK enthalten, wobei die Zugehörigkeit der mit 4 NK versehenen 4 Anaphasen zu einer Gruppenmitose durch das Vorhandensein von Zellkoppeln, die zwischen den Abkömmlingen einer sekundären Oogenie auftreten, gesichert ist.

Die Zahl der NK, die in 40 Gruppenmitosen des 2., 3. und 4. Teilungsschrittes aufgetreten sind, zeigt Tabelle 2.

Danach werden auch bei *Pales crocata* die NK normalerweise in der späten Interphase vor dem 2. Teilungsschritt gebildet; die Fälle, in denen nur 1 NK im 3. bzw. 4. Teilungsschritt beobachtet wurde, deuten vielleicht darauf hin, daß hier bereits die 1. Teilung der sekundären Oogenien eine Differentialteilung gewesen ist. Im 3. Teilungsschritt überwiegen dann die Gruppenmitosen mit 2 NK, im 4. Teilungsschritt

die mit 4 NK. Da bei *Pales crocata* nie der Fall beobachtet wurde, daß die NK während des 2. oder 3. Teilungsschrittes geteilt und bei den Anaphasenhälften zugeordnet wurden, müs-

Tabelle 2. Anzahl der Gruppenmitosen mit 1, 2, 3 bzw. 4 NK in 26 Ovarien von *Pales crocata*

	1 NK	2 NK	3 NK	4 NK
2. Teilungsschritt		3		
3. Teilungsschritt	1	9		4
4. Teilungsschritt	1	7	1	14

sen 1—2 der 4 bzw. 8 Interphasekerne in den Fällen, in denen die Zahl der NK im nächsten Teilungsschritt erhöht ist, die Fähigkeit zum Aufbau von neuen NK haben, ohne bei der abgelaufenen Teilung einen aufgenommen zu haben (vgl. Diskussion).

Wie es bereits für *Tipula caesia* beschrieben wurde, so hat auch *Pales crocata* für jeden Teilungsschritt eine charakteristische NK-Größe, was vermutlich durch die mit der Größenabnahme der Chromosomen einhergehende Verkürzung der heterochromatischen Bildungsorte bedingt ist, da auch die neuauftretenden NK stets die für den entsprechenden Teilungsschritt charakteristische Größe aufweisen. Die NK sind in der Metaphase meist kugelrund und bleiben zunächst in der Äquatorialebene liegen (Abb. 9a, b), um erst in der späten Anaphase ohne Verbindung mit den Chromosomen innerhalb der Spindel zu einem Pol zu wandern.

D. Die Chromosomen und Nukleinkörper während der 1. und 2. Wachstumsphase der Oocyten

Nach Abschluß der 4 Teilungsschritte der sekundären Oogenien liegen 16zellige Eianlagen vor, die von einem Folliklelepithel umgeben und dadurch gegeneinander abgegrenzt sind.

Bei *Tipula lateralis*, *T. oleracea* und *T. caesia* enthalten 2 der 16 Kerne bei *Pales crocata* — entsprechend der Inkonstanz der NK-Zahl in den

Gruppenmitosen der sekundären Oogonien — 1—4 Kerne je Eianlage einen NK. Die Zellen mit NK sind in der Eianlage stets benachbart angeordnet, die NK liegen der Kernmembran kalottenartig innen an und sind schwach vakuolisiert. Alle Kerne einer Eianlage haben zunächst einen lockeren reticulären Bau; in ihnen treten bei *T. lateralis*, *T. oleracea* und *P. crocata* ein Chromocentrum, bei *T. caesia* meist 3 Chromocentren auf, die einem einheitlichen Nukleolus ansitzen. NK und Chromocentren verschmelzen stets miteinander.

In der 1. Wachstumsphase wachsen alle Zellen einer Eianlage in kurzer Zeit gleichmäßig bis zu einer bestimmten Größe heran. Dabei treten die Chromosomen in den mit NK ausgestatteten Kernen in das Pachytänstadium ein. In der 2. Wachstumsperiode wird eine dieser Zellen nach Entspiralisierung des Pachytäns und Auflösung des NK unter starker Volumenzunahme zur definitiven Oocyte; die übrigen 15 Zellen sind Nährzellen.

Eine genaue Beschreibung des Eiwickelstadiums gibt BAUER (1931, 1932, 1933) für *Tipula paludosa*, bei der eine Determination einer bestimmten Zelle zum späteren Ei nicht erfolgt und alle Zellen einer Eianlage — mit und ohne NK — in der 1. Wachstumsperiode ein Pachytänstadium durchlaufen, also die Potenz haben, Eizelle zu werden. Bei den Arten mit geregeltem Verhalten der konstant 2 NK ist diese Potenz nur auf die beiden Zellen der Eianlage beschränkt, in denen die NK auftreten, so daß sich für diese Arten eine plasmatische Determination der beiden Zellen zu präsumtiven Oocytten, ähnlich den Erscheinungen bei den Dytisciden, vermuten läßt (vgl. Diskussion).

Das Verhalten der Chromosomen und NK in den beiden Wachstumsphasen wurde hauptsächlich an *Tipula lateralis* und *T. caesia* untersucht.

1. Wachstumsphase der Oocytten. Die 14 NK-freien Zellen der Eianlagen von *T. lateralis* und *T. caesia* wachsen in der 1. Wachstumsphase kontinuierlich heran und erreichen innerhalb kurzer Zeit ihre definitive Größe. Sie enthalten einen großen Nukleolus und ein reticuläres Interphasegerüst (Abb. 10a, 11b). Die beiden Zellen mit NK bleiben im Wachstum hinter dem der NK-freien Zellen zunächst zurück. Aus ihrem Chromatingerüst treten Fäden mit knotigen Verdichtungen hervor, womit das typische Bild des Pachytänstadiums erreicht wird (Abb. 10b, 11a).

Bei *Tipula lateralis* setzt in den Pachytänkern, kurz bevor diese die Größe der ausgewachsenen NK-freien Kerne erreichen, die Umbildung der Pachytänstruktur und die Auflösung des NK ein (Abb. 10c); nach dem Größenausgleich der Kerne sind die Chromosomen bis auf einige kleine Chromocentren vollkommen aufgelockert (Abb. 10d). Die NK werden nur unvollständig abgebaut, so daß die beiden Pachytänzellen durch einen wechselnd großen NK-Rest, der aus einer dünnen Rinde und einigen zentralen Vakuolen besteht, markiert bleiben. Der NK-Rest ist

dem Nukleolus angelagert (Abb. 10d). Eine der beiden Zellen mit NK-Rest wird gleich den NK-freien Zellen zur Nährzelle, die 2. Zelle mit NK-Rest tritt in die 2. Wachstumsperiode ein und wird zur definitiven Oocyte.

Bei *T. caesia* wird die Pachytänsstruktur am Ende der 1. Wachstumsperiode ebenfalls aufgelockert, die NK bleiben aber im Gegensatz zu *T. lateralis* erhalten. Auch hier wächst nur eine der 2 Zellen mit NK zur Oocyte heran; strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Zellen sind nicht zu erkennen.

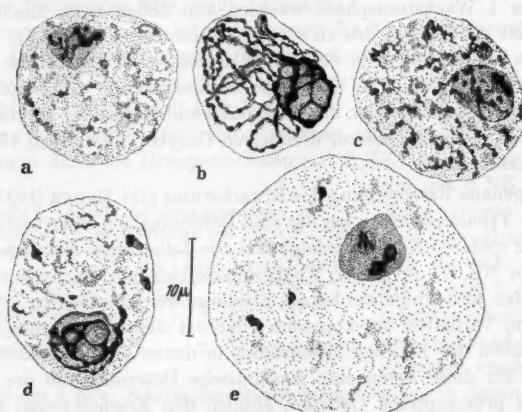


Abb. 10a—e. *Tipula lateralis*. Oocytes, 1. und 2. Wachstumsperiode. a Nährzellkern. b Pachytänskern mit Nukleinkörper. c Pachytänsabbau und Nukleinkörperzerfall. d Nach Abbau des Pachytäns, Nukleinkörperrest liegt dem Nukleolus an. e Definitive Oocyte zu Beginn der 2. Wachstumsphase. KE, OEM. Vergr. 1300

2. Wachstumsphase der Oocytes. In der 2. Wachstumsphase der definitiven Oocyte von *T. lateralis* wird der NK-Rest im Nukleolus (Abb. 10e, oberhalb des hantelförmigen Chromocentrum) langsam aufgelöst; danach erfolgt der Abbau des Nukleolus und die Auflockerung der Chromocentren. In den Oocytenkernen lassen sich danach keine feulgen-positiven Strukturen mehr nachweisen; auch nach Färbung mit Eisenhämatoxylin erscheint der Oocytenkern strukturlos.

Zu Beginn der 2. Wachstumsperiode tritt in der definitiven Oocyte von *T. caesia* der Nukleolus aus dem NK aus und legt sich ihm peripher an. Dann erscheint im NK eine große Anzahl Vakuolen, von denen zunächst einige peripher gelegene abgespalten werden, bis schließlich der NK in eine große Anzahl verschieden geformter Granula zerfällt (Abb. 11d), die sich langsam auflösen. Der Bereich um die sich auflösenden Granula gibt eine gleichmäßige schwache Feulgen-Reaktion. Am Nukleolus bleibt ein Rest des NK längere Zeit erhalten (Abb. 11e). Nach dem Verschwinden des Nukleolus und NK-Restes enthalten die Oocytes von *T. caesia*

nur noch die 3 Chromocentren (Abb. 11f), die sich kurz danach auch auflösen.

Am 6. Tag der bei *Tipula lateralis* 7 Tage währenden Puppenruhe erreicht der Oocytenkern seine maximale Größe. Er ist zentral in der der

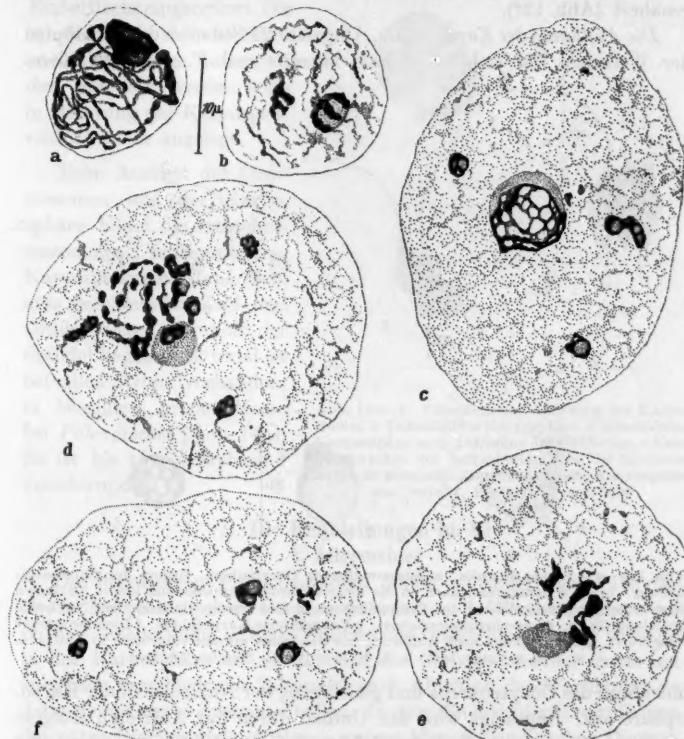


Abb. 11a-f. *Tipula caesia*. a, b erste, c-f 2. Wachstumsperiode. a Oocytenkern mit Nukleinkörper und Pachytän. b Ausgewachsener Nährzellkern. c Vakuolisierung des Nukleinkörpers, Nukleolus liegt dem Nukleinkörper peripher an. d Zerfall des Nukleinkörpers. e Nukleinkörper bis auf einen kleinen Rest am Nukleolus abgebaut. f Nach vollzogenem Abbau liegen nur die 3 Chromocentren vor. KE, OEM. Vergr. 1300

Mikropyle genäherten Eihälften eingeordnet und hat eine ovale Form. In dem bis dahin homogenen Oocytenkern erscheint eine meist sickelförmige lockere Karyosphäre mit schwacher Feulgen-Reaktion (Abb. 12a) in deren homogene Grundmasse kleine Vakuolen eingebettet sind (Abb. 12b). Am 7. Tage der Puppenruhe ist der Oocytenkern nahezu rund und hat nur die halbe Größe des Kernes des Vortages (Abb. 12c). Die Vakuolen sind zu einem großen Nukleolus zusammengetreten, dem

das stark kondensierte feulgenpositive Material kalottenartig anliegt. Kurz vor dem Schlüpfen der ♀-Imago ist der Oocytenkern abgeplattet unterhalb der Mikropyle zu finden (Abb. 12e); die Karyosphäre hat den Nukleolus umschlossen und liegt innerhalb des Kerns der Mikropyle genähert (Abb. 12f).

Die Auflösung der Karyosphäre. Ungefähr 24 Std nach dem Schlüpfen der Weibchen löst sich bei *Tipula lateralis* und *T. caesia* die Kern-

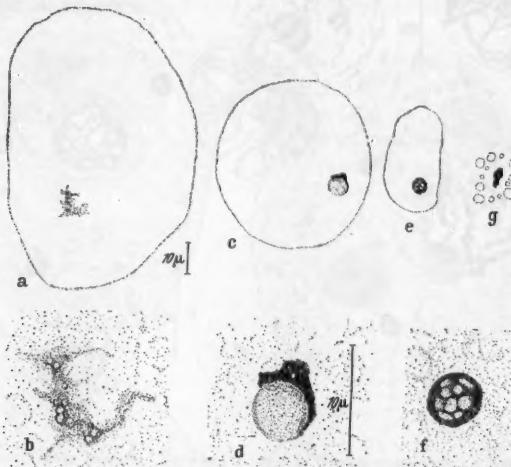


Abb. 12a—g. *Tipula lateralis*. a Ausgewachsener Oocytenkern, Beginn der Chromatinballung. b aus a herausgezeichnet, in die lockere Chromatinmasse sind kleine Nukleole eingebettet. c Verminderung des Kernvolumens. d Das Chromatin liegt dem Nukleolus kalottenartig an. d aus c herausgezeichnet. e Vakuolisierte Karyosphäre. f Dieselbe stärker vergrößert. g Karyosphäre nach Auflösung des Nukleolus, stärker vergrößert in Abb. 17a. a, c, e, g Vergr. 500. b, d, f Vergr. 1800. Schnitt, Feulgen

membran des Oocytenkerns und gleichzeitig der Nukleolus in der Karyosphäre auf. Angezeigt wird der Umbau durch das Auftreten feulgenpositiver Granula wechselnder Zahl und Größe in der Umgebung der Karyosphäre (Abb. 13a). Danach nimmt die Karyosphäre eine unregelmäßige rhombische Form an (Abb. 13b) und liegt in einem kleinen Plasmahof unterhalb der Mikropyle. Ihre Längsachse ist radiär zur Eioberfläche eingeordnet; innerhalb der Karyosphäre lassen sich bei *T. caesia* stets 2 der 3 rhombischen Tetraden deutlich erkennen; die dritte ist überdeckt. Ihre Längsachsen liegen parallel zueinander und bilden die Längsachse der Karyosphäre. Ihre seitlichen Ausbuchtungen sind die chiasmatisch gepaarten Schenkel der Bivalente (Abb. 13b).

Bei *Tipula lateralis* heben sich die 3 Bivalente als dunkler gefärbte Rhomben gegen die feulgenpositive Verbindungsubstanz deutlich ab.

Die Spindelansatzregionen der Bivalente ragen aus der Karyosphäre zipfelartig hervor (Abb. 12g, 17a). Wie bei *T. caesia* sind die Bivalente schon vor dem Auftreten der Spindel innerhalb der Karyosphäre parallel zueinander und radiär zur Eioberfläche eingeordnet. Die in den befruchteten Eiern nach der Ablage auftretenden Spindeln werden stets in Richtung der Karyosphärenlangssachse angelegt.

Beim Austritt der Chromosomen aus der Karyosphäre bildet die extrachromosomal feulgenpositive Karyosphärensubstanz Granula wechselnder Zahl und Größe; dieses außerhalb der Spindel liegende Material ist bei allen Arten vorhanden, in besonders großer Masse bei *Pales crocata* (Abb. 14a). Es ist bis zur Metaphase I verschwunden.

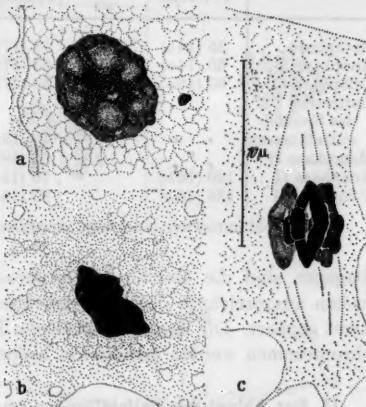


Abb. 13a—c. *Tipula caesia*. Auflösung der Karyosphäre. a Vakuolisierte Karyosphäre. b Rhombische Karyosphäre nach Auflösung des Nukleolus. c Kurz nach Ablage des befruchteten Eis, die Bivalente treten als kompakte Rhomben aus der Karyosphäre aus. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

E. Die Reifeteilungen im Ei

I. Allgemeines

Die meiotischen Prophasestadien laufen — außer dem Pachytän, das in den präsumptiven Oocyten während der 1. Wachstumsphase auftritt — teils in völlig diffusen Stadien des Oocytenkerns, teils verkapppt in der Karyosphäre ab, zu der sich die Chromosomen in einem art-spezifisch verschiedenen Zeitpunkt nach Abschluß des Wachstums der definitiven Oocyte zusammenballen. In dem die Karyosphäre aufbauenden extrachromosomal feulgenpositiven Material sind auch in Quetschpräparaten isolierter Oocytenerkerne keine Chromosomen als individuelle Strukturen erkennbar. Erst nach Auflösung des Nukleolus der Karyosphäre lassen sich die rhombischen Tetraden gegeneinander abgrenzen, doch hängen ihnen große Mengen extrachromosomal feulgenpositiven Materials an, so daß Einzelheiten nicht zu ermitteln sind. Somit muß sich die Untersuchung auf den Ablauf der beiden Reifeteilungen beschränken. Auskunft über die Zeitfolge der Meiose der 6 beschriebenen Arten gibt Tabelle 3.

Die Autosomen der untersuchten Arten sind in der RT I chiasmatisch gepaart und verhalten sich im Verlauf der Meiose recht gleichartig.

Tabelle 3. Zeitlicher Ablauf der Reifeteilungen in Minuten

Stadien	Arten					
	<i>P. crocata</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>T. lateralis</i>	<i>T. oleracea</i>	<i>T. paludosa</i>	<i>T. caesia</i>
Metaphase . .	35 (14c)	35 (15a)	18 (17f)	12 (19a)	20 (20a)	40 (21d)
Anaphase I . .	65 (14e)	60 (15c)	25 (17h)	30 (19d)	40 (20e)	55 (21f)
Telophase I . .	95 (16a)		30 (17i)	50 (19e)	60 (20g)	65 (22a)
Auftreten des Spindel- mittelkörpers			45 (18a)	60 (19f)		80 (22b)
Metaphase II . .			60 (18b)	75		90 (19i)
Anaphase II . .	120 (16b)		70 (18c)			110 (23b)
Telophase II . .	135 (16c)		85 (18d)	90 (19i)		130 (23d)

Die eingeklammerten Nummern verweisen auf die Abbildungen.

Dagegen sind die Geschlechtschromosomen durch abweichendes Verhalten ausgezeichnet und sind entweder achiasmatisch oder überhaupt nicht gepaart. Die Arten mit gleichem Paarungsmodus der Geschlechtschromosomen werden gemeinsam besprochen.

II. Der Ablauf der Reifeteilungen und das Chromosomenverhalten

a) Arten mit achiasmatischer Paarung der Geschlechtschromosomen

Pales crocata und *P. pratensis*. Nach der Auflösung der Karyosphäre sind die 3 Tetraden von *Pales crocata* als kompakte Rhomben in einem Plasmahof nahe dem Chorion eingebettet. Ihre Längsachsen liegen parallel, die als seitliche Ausbuchungen der Tetraden erkennbaren Chiasmen in einer Ebene (Abb. 14a). Die J-förmigen Geschlechtschromosomen treten stets deutlich von den Autosomtentraden getrennt aus der Karyosphäre aus. Sie sind in den meisten Zellen mit ihren langen Schenkeln terminal oder subterminal gepaart.

Nur in 2 von 47 untersuchten Eiern eines Geleges waren die Geschlechtschromosomen kurz nach Auflösung der Karyosphäre ungepaart (Abb. 14a). In 55 Prometaphasen und Metaphasen I des gleichen Geleges und in gleichen Stadien von 5 anderen Gelegen — insgesamt 180 Metaphasen I — bildeten sie andererseits stets ein Bivalent. Daraus ist es wahrscheinlich, daß die ausnahmsweise ungepaart aus der Karyosphäre heraustrgenden Heterosomen in der späten Prophase noch ein Bivalent bilden.

Die terminal gepaarten Geschlechtschromosomen bilden mit ihren langen Schenkeln ein weitklaffendes V, das mit seiner Öffnung den Tetraden stets zugekehrt ist (Abb. 14a, b). Der Winkel zwischen den beiden Chromosomen — auch zwischen Univalenten — beträgt vor Ausbildung der Spindel 120–140° (Abb. 14a), vergrößert sich im Laufe der Prometaphasestreckung (Abb. 14b) und beträgt in der Metaphase I

meist 180° (Abb. 14c). Die proximal der Paarungsbereiche gelegenen Abschnitte der langen Schenkel erfahren bei der in der Prometaphase und Metaphase I erfolgenden geradlinigen Ausrichtung des Bivalents

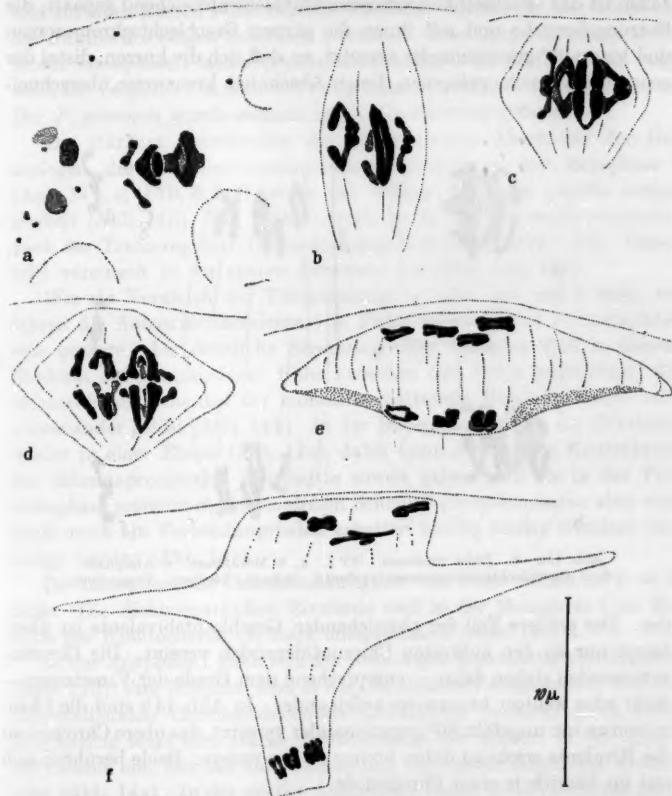


Abb. 14a-f. *Pales crocata*. Stadien der 1. Reifeteilung. a Kurz nach Auflösung der Karyosphäre. Die Längsachsen der Bivalente stehen senkrecht auf dem Chorion, dessen innere Begrenzung in den Abbildungen eingezzeichnet ist. Die Heterosomen sind ungepaart. Feulgenpositive Grana umgeben die Chromosomen. Prometaphase. c Metaphase. d Frühe Anaphase. e Mittlere, f späte Anaphase. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

zwischen den Polen keine Entspiralisierung. In der Metaphase I sind die kurzen Schenkel der Heterosomen meist polwärts umgeklappt (Abb. 14c).

In ungefähr 60% der untersuchten 55 Prometaphasen und Metaphasen I sind die Geschlechtschromosomen wie normale Bivalente

gepaart, es fehlt jedoch stets eine Chiasmenlücke, und in den distal der gepaarten Bereiche gelegenen Chromosomenenden sind die Chromatiden nicht auseinander gespreizt. In den restlichen 40% der untersuchten Zellen ist das Geschlechtschromosomenbivalent abweichend gepaart, die Paarungsbereiche und mit ihnen die ganzen Geschlechtschromosomen sind bis zu 90° gegeneinander versetzt, so daß sich die kurzen, distal der gepaarten Bereiche gelegenen, freien Abschnitte kreuzweise überschnei-

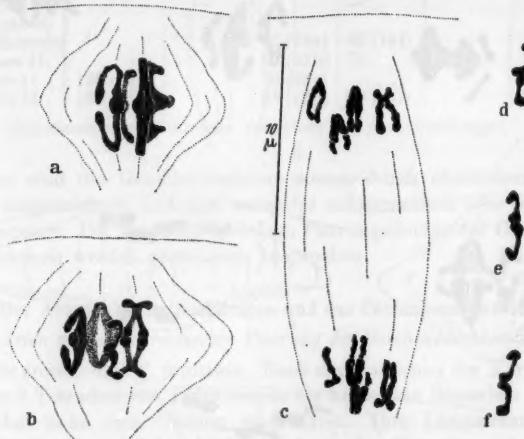


Abb. 15a-f. *Pales pratensis*. RT I. a, b Metaphase. c Anaphase.
d-f Geschlechtschromosomenbivalente. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

den. Der größere Teil der abweichenden Geschlechtsbivalente ist überhaupt nur an den äußersten Chromatidenenden vereint. Die Chromosomenenden stehen dann — entsprechend dem Grade der Versetzung — mehr oder weniger kreuzweise aufeinander. In Abb. 14b sind die Chromosomen um ungefähr 60° gegeneinander versetzt, das obere Chromosom des Bivalents erscheint daher breiter als das untere. Beide berühren sich nur im Bereich je einer Chromatide.

Das gleiche abweichende Verhalten zeigen die Geschlechtschromosomen von *Pales pratensis*, bei der in 19 der 32 untersuchten Metaphasen I (etwa 60%) die Partner des Geschlechtschromosomenbivalents gegeneinander gedreht waren, und zwar in den meisten Fällen um ungefähr 90° (Abb. 15b), vereinzelt aber auch um ungefähr 180° (Abb. 15d). Da bei *P. pratensis* die ungepaarten Chromosomenendabschnitte innerhalb eines Geschlechtschromosomenbivalents meistens verschieden lang sind, kann aus der Länge des längsten überstehenden Abschnittes (Abb. 15d) und dem Bereich, mit dem das andere Homologe Kontakt

hat, die Gesamtlänge des Paarungssegmentes bestimmt werden, das sich ungefähr über das letzte Drittel des langen Schenkels der Heterochromosomen erstreckt. Dagegen ist der Paarungsbereich bei *Pales crocata* nur auf einen kurzen subterminalen Abschnitt beschränkt, der höchstens ein Fünftel des langen Schenkels ausmacht. Den Längenunterschied der in der Metaphase I lateral gepaarten Abschnitte der Heterosomen zeigt auch ein Vergleich von Abb. 15d (*P. pratensis*) und Abb. 14c (*P. crocata*). Bei *P. pratensis* wurde niemals terminale Paarung gefunden.

Die stärkere Spiralisierung der subterminalen Abschnitte der Homologen des Geschlechtschromosomenbivalents in der Metaphase I (Abb. 14b, c, 15b, d, e, f) ist in der frühen Anaphase bereits ausgeglichen (Abb. 14d). Bei beiden Arten ist in den Heterochromosomen nach der Trennung kein Chromatidenspalt sichtbar (Abb. 15d). Dieser tritt vereinzelt in der späten Anaphase auf (Abb. 14e, 16c).

Wie ein Vergleich der Tetradenlänge in Abb. 14a und b zeigt, erfahren die Autosomenbivalente von *Pales crocata* in der Prometaphase eine geringe, aber deutliche Streckung. Die Tetraden sind in diesem Stadium auf verschiedener Höhe zwischen den Polen angeordnet, die chiasmafreien Schenkel der monochiasmatischen Bivalente haben sich voneinander gelöst (Abb. 14b). In der Metaphase I liegen die Bivalente wieder in einer Ebene (Abb. 14c), dabei kann die erneute Kontraktion der chiasmaproximalen Abschnitte soweit gehen, daß die in der Prometaphase getrennten chiasmafreien Schenkel (zwischen denen aber vielleicht noch ein Verbindungsfaden erhalten bleibt) wieder terminal vereinigt werden (Abb. 14c).

Die metaphasische Chiasmenhäufigkeit von *Pales crocata* ist 3—4 je Zelle. Die dichiasmatischen Bivalente sind in der Metaphase I im Bereich der Kinetochoren oft stark entspiralisiert (Abb. 14c).

In der Anaphase I lösen sich die Homologen gleichzeitig voneinander (Abb. 14d); ihre Schenkel sind in die Chromatiden aufgespalten und die chiasmadistalen Chromatidenenden kolbenartig verdickt (Abb. 14d). Gleichzeitig setzt eine starke Verbreiterung der Spindel in der Äquatorialebene ein, mit der eine Verkürzung der Spindellängsachse einhergeht (Abb. 14e). In der späten Anaphase I liegen die Dyaden der peripheren Anaphasegruppe I entweder mit beidem Schenkeln (Abb. 14e, rechte Dyade, 14f, zweite von links), oder — wenn das Umklappen der Schenkel unterbleibt — mit dem langen Schenkel dem abgeplatteten Pol an (Abb. 14e, die 3 von links, 14f, rechts und links außen). Die Dyaden der inneren Anaphasegruppe I sind stark kontrahiert und behalten die V-Form bei und wandern in die im Bereich der inneren Anaphasegruppe auftretende zungenartige Ausbuchtung der Spindel ein (Abb. 14f). In der Telophase I tritt in den umgeklappten Dyaden ein deutlicher Chromatidenspalt auf (Abb. 16a). Ein Interkinese-Ruhekern-

Stadium wird nicht durchlaufen; die Telophasechromosomen ordnen sich direkt zur Metaphase II um.

In der inneren Spindel teilen sich die Chromosomen synchron und wandern in der Anaphase auf gleicher Höhe polwärts (Abb. 16b); die innere Telophasegruppe bildet den ♀-Vorkern (Abb. 16c). In der Anaphase II der peripheren Spindel trennen sich dagegen die Chromosomen

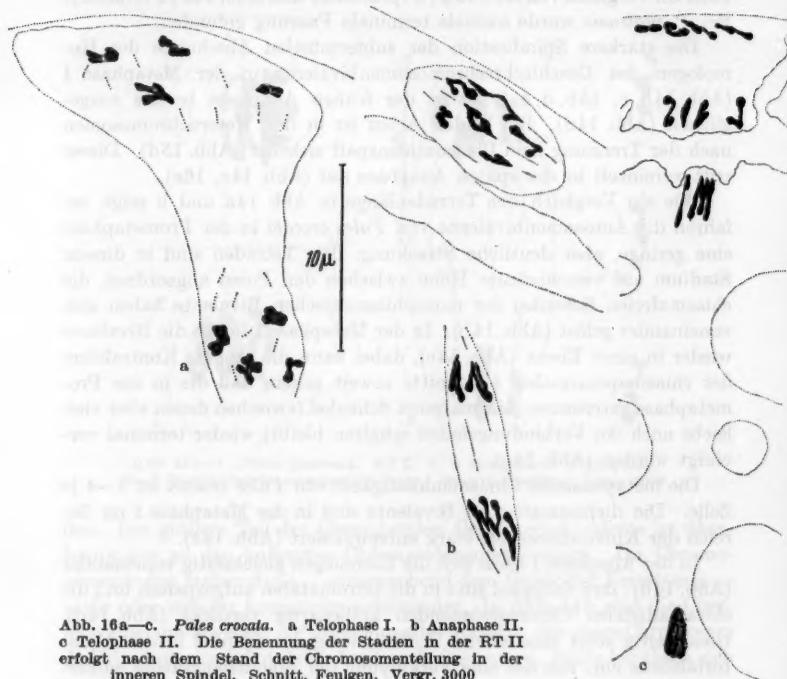


Abb. 16a—c. *Pales crocata*. a Telophase I. b Anaphase II. c Telophase II. Die Benennung der Stadien in der RT II erfolgt nach dem Stand der Chromosomenteilung in der inneren Spindel. Schnitt, Feulgen, Vergr. 3000

nicht gleichzeitig (Abb. 16b). Verschieden lange Abschnitte der Anaphasechromosomen können polwärts umgeklappt sein (Abb. 16b).

Der Autosomenbestand von *Pales pratensis* setzt sich aus 2 nahezu gleichschenkligen Tetraden (Abb. 15a, b, 1. und 2. Tetrade von links) und einer stark ungleichschenkligen Tetrade (Abb. 15a rechts, teilweise verdeckt, und Abb. 15b rechts außen) zusammen. Die metaphatische Chiasmenhäufigkeit beträgt 3—5 je Zelle. Die Homologen des stark ungleichschenkligen Bivalents sind nur im langen Schenkel durch ein Chiasma vereinigt. Die kurzen Schenkel sind bereits in der Metaphase in

ihre Chromatiden aufgespalten und polwärts umgeklappt (Abb. 15b, rechte Tetrade). Die Schenkel, die chiasmatisch gepaart waren, sind in der Anaphase weniger kontrahiert und haben stärker klaffende Chromatiden (Abb. 15c).

b) Arten ohne Paarung der Geschlechtschromosomen

Tipula lateralis. Bei *Tipula lateralis* lösen sich die Geschlechtschromosomen ungepaart aus der Karyosphäre (Abb. 17b) und liegen während der RT I als Univalente vor (Abb. 17b, c, d, e, f). Sie eilen bis zur späten Anaphase I polwärts voraus (Abb. 17i), und zwar peripher in der Spindel, deutlich von den Autosomen getrennt (Abb. 17d). Zunächst sind die Schenkel der Univalente über ihre ganze Länge vereint (Abb. 17b, c), doch geben sie den Kontakt mit beginnender Entspiralisierung in den proximalen Regionen auf. Danach sind nur noch die stärker kontrahierten Endabschnitte vereint oder einander stark genähert (Abb. 17d, g). In der späten Anaphase ist die maximale Entspiralisierung erreicht (Abb. 17h). Vereinzelt lässt sich dann der Chromatidenspalt in den verdickten Enden erkennen (Abb. 17h). Die beiden Schenkel sind meistens gleich lang (Abb. 17d, g₁) und haben nur selten das mitotische Längenverhältnis von 1:2 (Abb. 17e, f, h). In der Telophase I unterscheiden sich die Geschlechtschromosomen durch ihre geringere Kontraktion deutlich von den Autosomen (Abb. 18a).

Die metaphasische Chiasmenhäufigkeit bei *Tipula lateralis* ist 3—5 je Zelle. Die Autosomentetraden zeigen eine starke Prometaphasestreckung, wie ein Vergleich der Tetrade längen von Abb. 17b und f erkennen lässt. In der frühen Anaphase tritt deutlich der Chromatidenspalt auf. Die chiasmadistalen Abschnitte der auseinanderweichenden Homologen sind oft durch chromatische Fäden verbunden (Abb. 17g).

Die Umordnung der Chromosomen zur Metaphase II und die Trennung der Chromatiden erfolgt in der peripheren Chromosomengruppe asynchron. Innerhalb einer Spindel treten getrennte Chromatiden und noch nicht eingeordnete Dyaden nebeneinander auf (Abb. 18c). Die Autosomen ordnen sich vor der Teilung stets in einer Ebene an, während sich die Heterosomen ohne vorherige Umordnung teilen können (Abbildung 18b, d).

In der inneren Spindel ordnen sich alle Chromosomen gleichzeitig zur Metaphase II um und treten synchron in die Anaphase II ein (Abb. 18b, c). In der frühen Anaphase II eilen die Geschlechtschromosomen voraus (Abb. 18e).

Tipula oleracea. Auch bei *Tipula oleracea* liegen die Geschlechtschromosomen in der RT I als Univalente vor und treten ungepaart aus

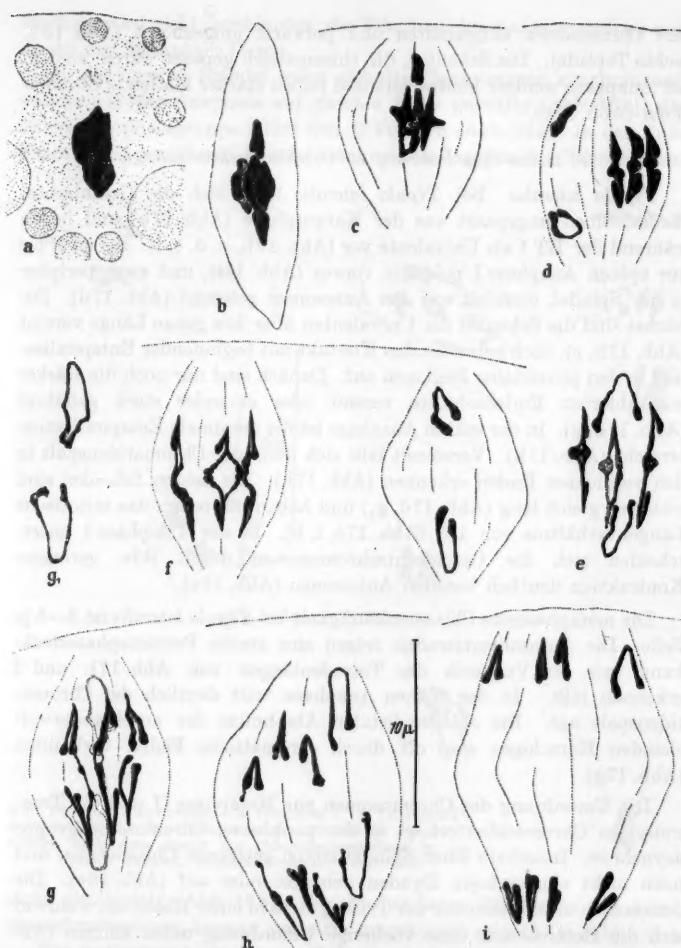


Abb. 17 a—i. *Tipula lateralis*. Erste Reifeteilung. a Karyosphäre im Ei kurz vor dessen Ablage. Die radikal eingeordneten Bivalente lassen sich gegeneinander abgrenzen. Die Kinetochorearegionen ragen zifelartig hervor. b—d Prometaphase; e, f Metaphase; in f bilden die Univalente eine separate Spindel. g Frühe Anaphase; g, e Geschlechtschromosomen aus g herausgezeichnet. h Mittlere, i späte Anaphase. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

der Karyosphäre aus. In der Metaphase I sind sie in der Spindel über-einander angeordnet (Abb. 19a) und wandern bis zur mittleren Anaphase den Autosomen voraus (Abb. 19a, b, c). Die metaphasische Chiasmen-

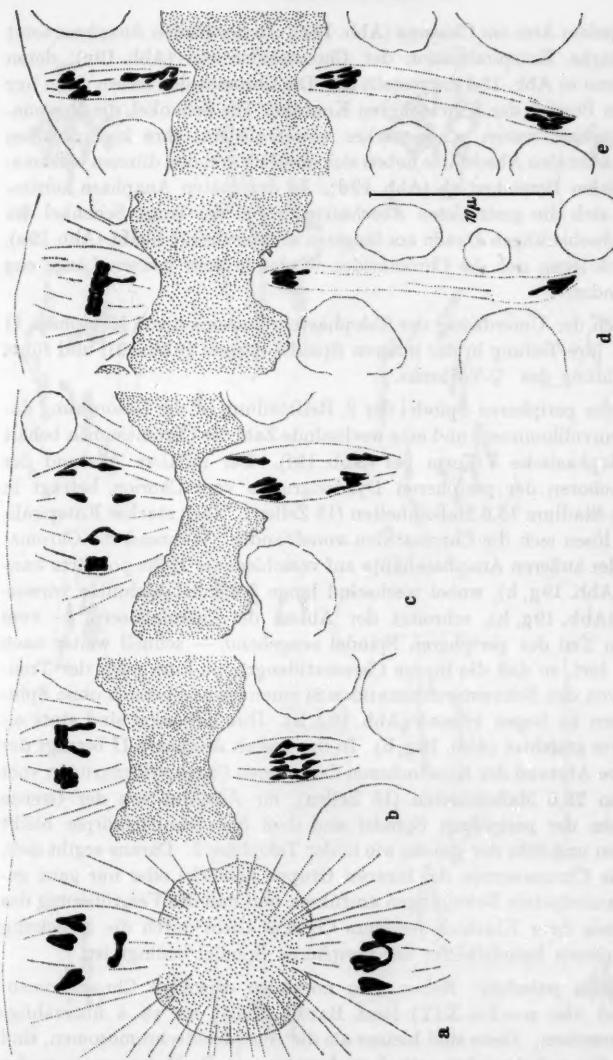


Abb. 18a—e. *Tipula lateralis*. a Telophase I. b—e Zweite Reifeteilung. a Frühe, c mittlere Anaphase. d, e Späte Anaphase-Telophase II.
Schulte, Fünfgen. Vergr. 3000

häufigkeit bei *T. oleracea* ist 4—5 je Zelle; eine der 3 Tetraden — durch die langen chiasmadistalen Abschnitte im langen Arm gekennzeichnet — stellt das Bivalent des ungleichschenkligen Autosomenpaars dar und

hat in jedem Arm ein Chiasma (Abb. 19a). In der frühen Anaphase setzt eine starke Entspiralisierung der Chromatiden ein (Abb. 19c), deren Maximum in Abb. 19d dargestellt ist. Die Chromatiden haben dann nur noch im Bereich der Kinetochoren Kontakt. Die Schenkel, die chiasmatisch gepaart waren, sind stärker entspiralsiert; ihre kontrahierten chiasmadistalen Abschnitte heben sich deutlich von den dünnen chiasmaproximalen Bereichen ab (Abb. 19d). In der späten Anaphase kontrahieren sich die gestreckten Abschnitte, wobei der lange Schenkel der ungleichschenkligen Dyade am längsten entspiralsiert bleibt (Abb. 19e). Zugleich legen sich die Chromatiden wieder in ihrer ganzen Länge eng aneinander.

Nach der Umordnung der Telophasechromosomen zur Metaphase II erfolgt ihre Teilung in der inneren Spindel normal (Abb. 19i) und führt zur Bildung des ♀-Vorkerns.

In der peripheren Spindel der 2. Reifeteilung ist die Umordnung dagegen unvollkommen, und eine wechselnde Zahl der Chromosomen behält die telophasische V-Form bei (Abb. 19f). Der mittlere Abstand der Kinetochoren der peripheren Dyadengruppe vom Chorion beträgt in diesem Stadium 15,6 Maßeinheiten (15 Zellen). Nach starker Entspiralisierung lösen sich die Chromatiden voneinander. Während die Chromatiden der äußeren Anaphasehälfte auf verschiedener Höhe polwärts wandern (Abb. 19g, h), wobei wechselnd lange Schenkelabschnitte voraus-eilen (Abb. 19g, h), schreitet der Abbau der Spindelfasern — vom inneren Teil der peripheren Spindel ausgehend — schnell weiter nach außen fort, so daß die innere Chromatidengruppe kurz nach der Trennung von den Schwesterchromatiden in einen Spindelbereich ohne Spindelfasern zu liegen kommt (Abb. 19g, h). Ihre Schenkel sind stets ei-einwärts gerichtet (Abb. 19g, h). In der späten Anaphase II beträgt der mittlere Abstand der Kinetochoren der inneren Chromatidengruppe vom Chorion 22,5 Maßeinheiten (15 Zellen), ihr Abstand von der Grenze zwischen der peripheren Spindel und dem Spindelmittkörper bleibt dagegen ungefähr der gleiche wie in der Telophase I. Daraus ergibt sich, daß die Chromosomen der inneren Gruppe keinerlei oder nur ganz geringe zentripetale Bewegungen ausführen und daß die Vergrößerung des Abstands ihrer Kinetochoren vom Chorion allein durch die Streckung der äußeren Spindelhälfte der peripheren Spindel bedingt ist.

Tipula paludosa. Neben dem normalen diploiden Chromosomenbestand von $n = 3 + X(Y)$ fand BAUER (1931) bis zu 4 überzählige Chromosomen. Diese sind kleiner als die Geschlechtschromosomen, sind gleich diesen heterochromatisch und zeigen wie die Heterosomen weder Paarung untereinander, noch mit Autosomenabschnitten. Die Anzahl der Überzähligen schwankt inter- und intraindividuell; ihre Entstehung

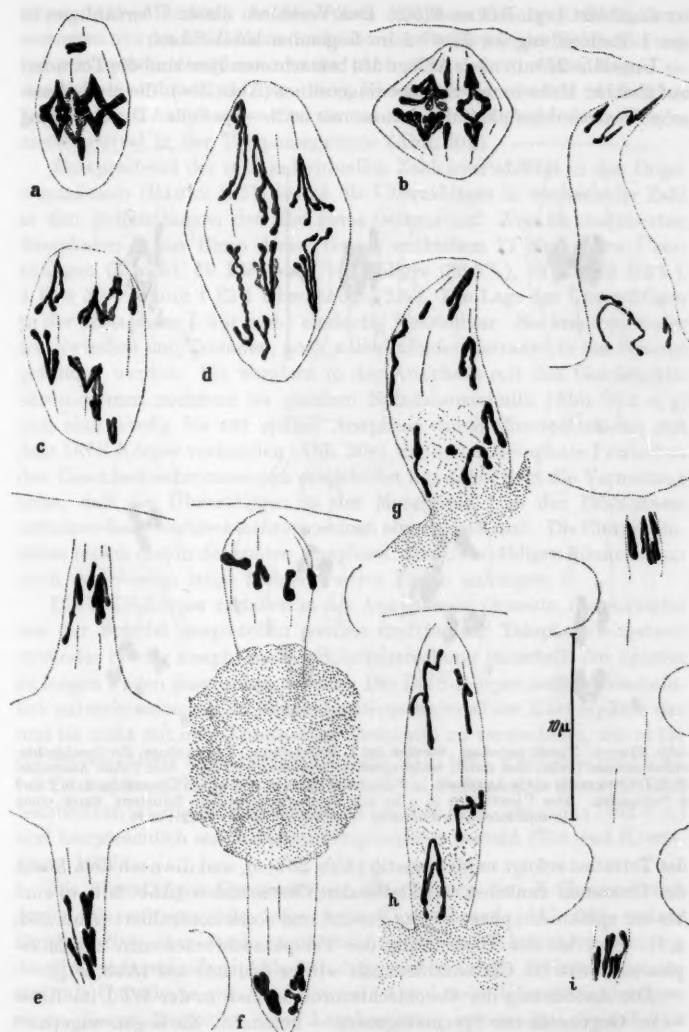


Abb. 19a-i. *Tipula oleracea*. a-f RT I. g-i RT II. a Metaphase. b Frühe Anaphase. c Mittlere Anaphase. d Späte Anaphase. e, f Telophase. g, h Peripherie Spindel der RT II. i Späte Anaphase II. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

ist ungeklärt (vgl. BAUER 1956). Das Verhalten dieser Überzähligen in der 1. Reifeteilung im Ei wird im folgenden beschrieben.

Ungefähr 25 min nach Ablage des befruchteten Eies sind die Tetraden auf gleicher Höhe in der Spindel eingeordnet (Abb. 20a); die metaphasische Chiasmenhäufigkeit der Autosomen ist 3—4 je Zelle. Die Trennung

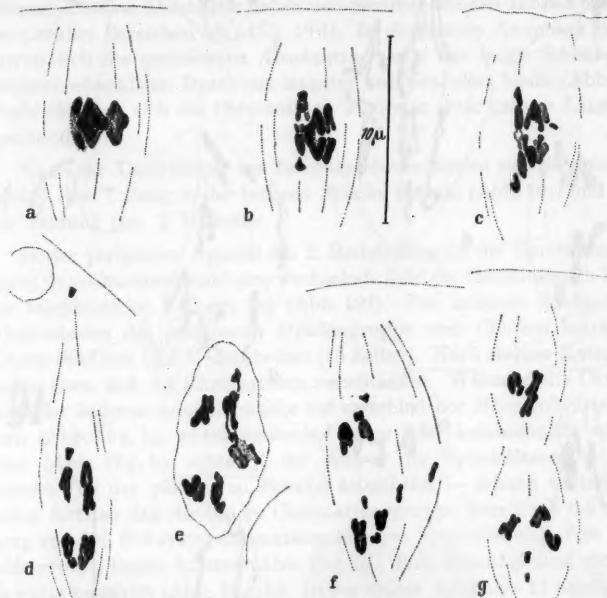


Abb. 20a—g. *Tipula paludosa*. Stadien der 1. Reifeteilung. a Metaphase, die Geschlechtschromosomen (links) sind durch feulgenpositive Substanz verklebt. b, c Frühe Anaphase. d, e, f Mittlere bis späte Anaphase. g Telophase. In c, d, e, g ist ein Überzähliges, in f sind 4 vorhanden. Das Überzählige in e ist mit der feulgenpositiven Substanz durch einen Chromatinfaden verbunden. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

der Tetraden erfolgt ungleichzeitig (Abb. 20b, c), und die nach dem Lösen der Chiasmen zunächst weitklaffenden Chromatiden (Abb. 20b, c) sind bis zur späten Anaphase wieder vereint und stark kontrahiert (Abb. 20d, e, f). Erst bei der Umordnung der Telophasechromosomen zur Metaphase II tritt ein Chromatidenspalt wieder deutlich auf (Abb. 20g).

Die Anordnung der Geschlechtschromosomen in der RT I im Ei ist — im Gegensatz zur Spermatogenese — konstant. Sie liegen ungepaart übereinander in der Spindel und sind häufig in eine zwischen ihnen ausgespannte feulgenpositive Masse eingebettet (Abb. 20a). Ihre Kinetochoren sind mit denen der Tetraden in der Metaphase in einer Ebene

angeordnet (Abb. 20a). In der frühen Anaphase lösen sich die X-Chromosomen aus der DNS-Masse und eilen den Dyaden in der Polwanderung bis zur späten Anaphase voraus (Abb. 20b, c, d, e), dabei lassen sie deutlich die submedianen Lage ihrer Kinetochoren erkennen (Abb. 20c). In der späten Anaphase werden sie von den Dyaden eingeholt und liegen meist zentral in der Telophasegruppe (Abb. 20g).

Entsprechend der intraindividuellen Zahlenvariabilität in den Oogenen mitosen (BAUER 1931) treten die Überzähligen in wechselnder Zahl in den Reifeteilungen der Eier eines Geleges auf. Von 52 analysierten Anaphasen I von Eiern dreier Gelege enthielten 17 Eier keine Überzähligen (32,5%), 19 Eier ein Überzähliges (36,5%), 12 Eier 2 (23%), 3 Eier 3 (6%) und 1 Ei 4 Überzählige (2%). Die Lage der Überzähligen in der Metaphase I war nicht eindeutig feststellbar. Sie konnten weder frei zwischen den Tetraden, noch außerhalb der Tetraden in der Spindel gefunden werden. Sie wandern in der Anaphase mit den Geschlechtschromosomen meistens im gleichen Spindelausschnitt (Abb. 20d, e, g) und sind häufig bis zur späten Anaphase durch Chromatinfäden mit dem DNS-Körper verbunden (Abb. 20e), der in der Metaphase I zwischen den Geschlechtschromosomen ausgebildet ist; daher liegt die Vermutung nahe, daß die Überzähligen in der Metaphase I in der DNS-Masse zwischen den Geschlechtschromosomen eingebettet sind. Die Chromatinfäden reißen erst in der späten Anaphase; den Überzähligen können dann noch verschiedene lange feulgenpositive Fäden anhängen.

Die DNS-Körper zerfallen in der Anaphase in Granula, die entweder aus der Spindel ausgestoßen werden und bis zur Telophase abgebaut sind oder bei der anaphasischen Spindelstreckung innerhalb der Spindel zu langen Fäden ausgezogen werden. Der DNS-Körper stellt wahrscheinlich extrachromosomales, feulgenpositives Material der Karyosphäre dar und ist nicht mit dem Eliminationschromatin zu verwechseln, wie es für die Meiose einiger Lepidopteren (SEILER 1914, 1923, FROLOWA 1935 u. a.), bei Trichopteren (KLINGSTEDT 1931) und bei *Pediculopsis* (COOPER 1939) beschrieben ist, das feulgennegativ ist (BAUER 1933, FROLOWA 1935 u. a.) und hauptsächlich aus Ribosenukleoproteinen besteht (RIS und KLEINFELD 1952).

Die überzähligen Chromosomen, die sich von den X-Chromosomen durch die subterminale Lage ihrer Kinetochoren (Abb. 20f, untere Gruppe, 20g), ihre stark variierende Größe und schwächere Färbung deutlich unterscheiden (Abb. 20c, f, g), treten in der frühen Anaphase stets als Univalente auf. In Zellen mit 2 und mehr Überzähligen zeigen sie zu diesem Zeitpunkt keine Lagebeziehung zueinander, die auf eine chiasmatische oder nichtchiasmatische Paarung in der Metaphase schließen ließe. Im Gegensatz zu den X-Chromosomen führen die Überzähligen keine geordnete Anaphasebewegung aus; innerhalb einer Spindel

kann ein Teil der Überzähligen einer Anaphasegruppe nachwandern (Abb. 20f), der andere Teil der anderen Anaphasehälfte vorausseilen (Abb. 20f), dabei kann sich die Spindel im Bereich der vorausseilenden Überzähligen stark strecken (Abb. 20d).

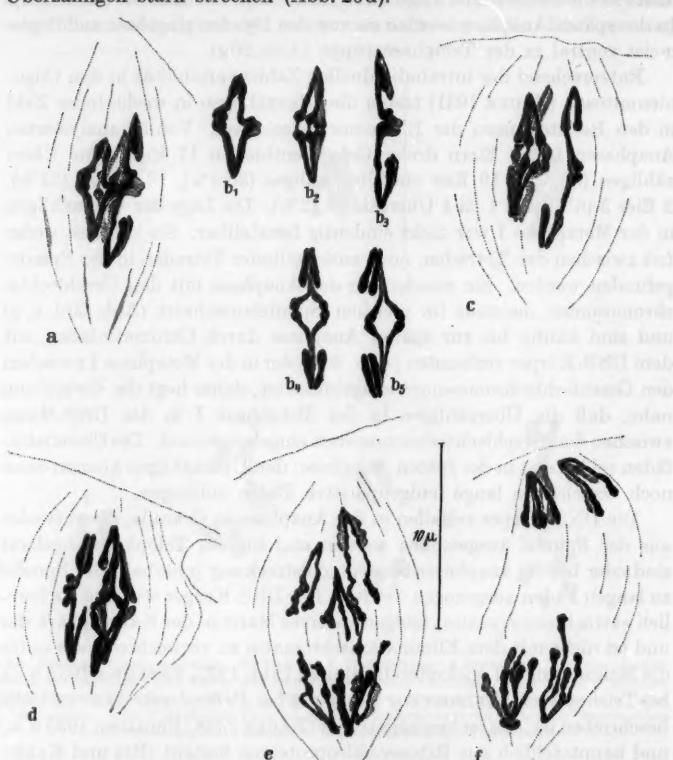


Abb. 21a—f. *Tipula caesia*. RT I. a, c, d Metaphase. b₁, b₂, b₃ Bivalente aus a herausgezeichnet. b₄, b₅ Tetraden mit deutlichem Chiasmenloch. e Frühe Anaphase. f Mittlere Anaphase. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

Die Befunde über die Verteilung der überzähligen Chromosomen in 35 Anaphasen der RT I sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

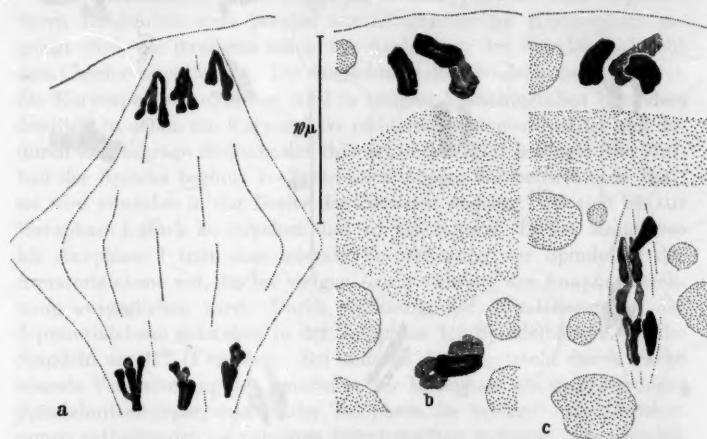
Danach gelangen von den insgesamt 56 Überzähligen der 35 Oocyten 29 in die periphere und 27 in die zentripetale Anaphasehälfte. Die Verteilung erfolgt also zufallsgemäß.

c) Arten ohne Geschlechtschromosomen

Tipula caesia. Die Meiose im Ei dieser Art ist ebenfalls normal chiasmatisch im Gegensatz zum ♂, wo BAUER (1956) eine achiasmatische

Tabelle 4. Anordnung der Überzähligen in der Anaphase I von *Tipula paludosa*

	Anzahl der Überzähligen je Oocyte				
	1	2	3	4	
Lage der Überzähligen in der peripheren (p) oder zentripetalen (z) Anaphasehälfte	p 1	z 1	p 2	p + z 1	z 2
Anzahl der Oocyten	7	12	4	7	1
Anzahl der untersuchten Oocyten = 35.					

Abb. 22a—c. *Tipula caesia*. a Telophase I. b Metaphase II. c Frühe Anaphase II. Schnitt, Feulgen. Vergr. 3000

Meiose fand. Die 3 großen Tetraden lösen sich nach dem Aufbau der Spindel voneinander und ordnen sich in gleicher Höhe in ihr ein (Abb. 13c). Während der Prometaphasestreckung werden die monochiasmatischen Bivalente um das Doppelte, die Bivalente mit 2 Chiasmen auf etwa das $1\frac{1}{2}$ -fache ihrer Ausgangslänge ausgezogen (Abb. 21a, c, d). Unterschiede im Spiralisationsgrad der chiasmaproximalen Abschnitte können eine Ungleichheit der Homologen eines Bivalents vortäuschen (Abb. 21d). Die chiasmafreien Schenkel trennen sich kurz vor der maximalen Streckung, ihre Chromatiden klaffen weit auseinander und sind oft verschieden stark entspiralisiert (Abb. 21d). Die Chiasmenhäufigkeit ist 3—5 je Zelle; die ungleichschenklige Tetrade (Abb. 21b, c, rechts außen) ist nur im langen Schenkel chiasmatisch gepaart.

Nach dem Lösen der Chiasmen entspiralisieren sich die Chromatiden der chiasmafreien Schenkel und die chiasmaproximalen Abschnitte

(Abb. 21e). Die Chromatiden sind in der frühen Anaphase nur im Bereich der Kinetochoren vereinigt (Abb. 21e). Die chiasmadistalen Chromatidenenden der auseinanderweichenden Dyaden sind verdickt und oft durch feine Chromatinfäden verbunden (Abb. 21e), die erst in der späten

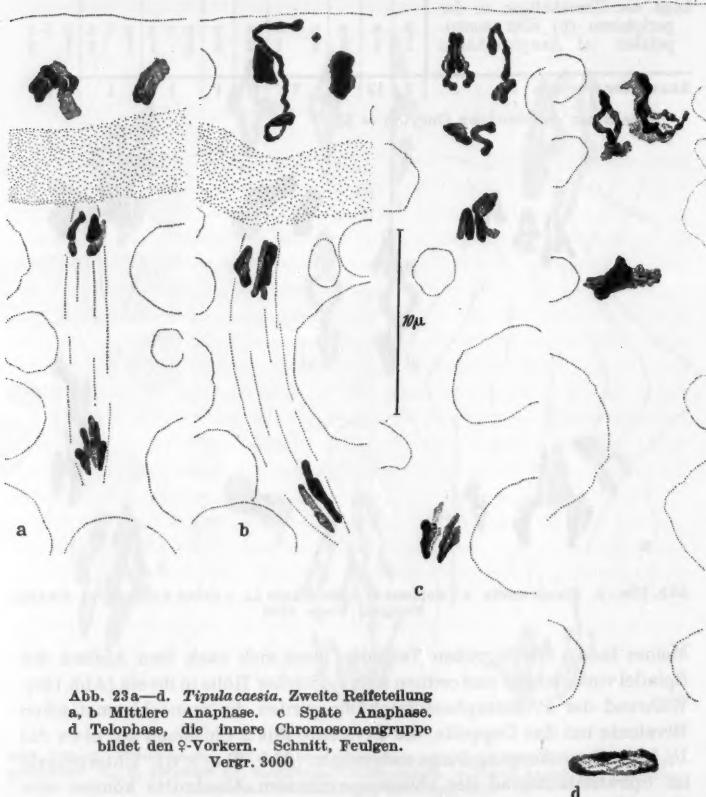


Abb. 23a—d. *Tipula caesia*. Zweite Reifeteilung
a, b Mittlere Anaphase. c Späte Anaphase.
d Telophase, die innere Chromosomengruppe
bildet den ♀-Vorkern. Schnitt, Feulgen.
Vergr. 3000

Anaphase durchreißen. Bis zur Telophase werden die Spiralisationsunterschiede ausgeglichen (Abb. 21f, Abb. 22a). Unter weiterer Kontraktion klappen schließlich die Schenkel auseinander.

Nach vollzogener Umordnung zur Metaphase II (Abb. 22b) teilt sich die innere Dyadengruppe normal (Abb. 22c, Abb. 23a, b, c, d). Ihre innere Anaphasegruppe bildet den ♀-Vorkern (Abb. 23d). Die periphere Dyadengruppe macht keine geordnete Teilung durch, da in der RT II

keine Spindel um sie aufgebaut wird. Die Anordnung der peripheren Gruppe ist unregelmäßig (Abb. 22a, b, Abb. 23a); die Dyaden in ihr entspiralisieren sich (Abb. 23b, c, d), und in einer wechselnden Zahl von ihnen lösen sich die Chromatiden voneinander (Abb. 23c, d). Nach Beendigung der RT II verschmelzen die Chromosomen der peripheren Gruppe und bilden einen unregelmäßigen Klumpen.

III. Die Formveränderungen der Spindel während der Reifeteilungen

a) Allgemeines

Die untersuchten Arten zeigen als Grundtypus eine Tonnenspindel, deren Längsachse stets parallel zur Längsachse der Karyosphäre angelegt wird, die ihrerseits schon vor Ausbildung der Spindel senkrecht zum Chorion orientiert ist. Die Ausrichtung der Spindellängsachse durch die Karyosphärenlängsachse wird in einigen Ausnahmefällen besonders deutlich, in denen die Karyosphäre nicht radiär eingeordnet ist und dadurch eine schräge Stellung der Spindel in der RT I bedingt. Der Aufbau der Spindel beginnt 1—2 min nach Ablage des befruchteten Eies; sie wird zunächst in der Breite der Tetradsen angelegt, um sich bis zur Metaphase I stark zu strecken und zu verbreitern. In der Metaphase bis Anaphase I tritt eine laterale Verbreiterung der Spindel in der Äquatorialebene auf, die bei einigen Arten während der Anaphasestreckung ausgeglichen wird. Durch Auflösung der Spindelfasern in der Äquatorialebene entstehen in der Telophase I 2 Spindelhälften, die die Spindeln der RT II ergeben. Bei anderen Arten entsteht durch starke laterale Verbreiterung der Spindel in der Metaphase ein diskusförmiger Spindelmittelpunkt, dem in der Telophase die beiden — die Chromosomen enthaltenden — polnahen Spindelhälften anliegen. Die Spindelfasern des Spindelmittelpunkts (dem Thelyid der älteren Arbeiten) werden in der Telophase I abgebaut. Danach trennen sich die Spindelhälften vom Spindelmittelpunkt und bilden bei einigen Arten direkt die Spindeln der RT II; bei anderen Arten werden sie partiell oder total abgebaut, um bis zur Metaphase II teilweise oder ganz neu zu entstehen. Allen Arten fehlen Polstrahlung und Centren.

Diese Vorgänge laufen im Prinzip gleichartig ab, doch treten artspezifische Modifikationen auf. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Arten besprochen werden, stimmt mit der des vorangegangenen Kapitels überein.

b) Die Spindelveränderungen der einzelnen Arten

Bei *Pales crocata* ist die Spindel in der Prometaphase tonnenförmig (Abb. 24a). Nach Verkürzung der Spindel auf ungefähr die Hälfte der Ausgangslänge treten in der Metaphase I in der Äquatorialebene seitliche Ausbuchtungen der Spindel auf (Abb. 24b), die in der Anaphase I stärker

werden (Abb. 24c). Während der Verbreiterung schließen sich die die Spindel begrenzenden Spindelfasern im Bereich der Pole zusammen (Abb. 24d, e), so daß die Spindel in der Anaphase eine geschlossene Linsenform hat (Abb. 24e) und mehr als doppelt so breit wie lang ist. Ihre äußerlichen seitlichen Bereiche sind schwach nach innen gebogen (Abb. 24e). Die Spindelfasern laufen zwischen den Chromosomen parallel zur Spindellängsachse, in den lateralen Ausbuchtungen sind sie mit zu-

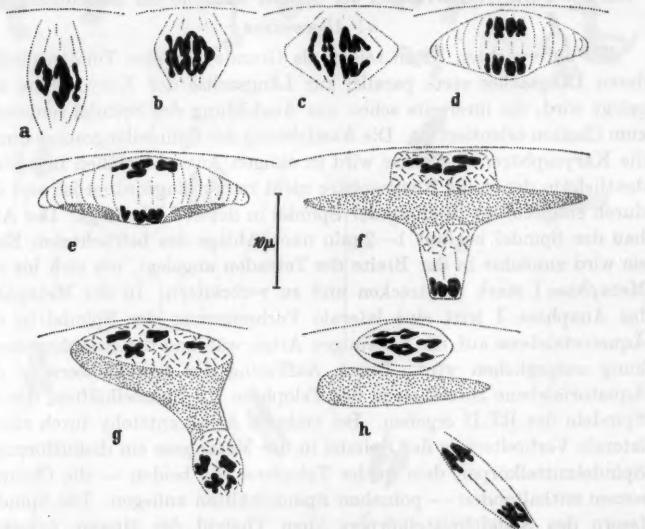


Abb. 24a-h. *Pales crocata*. Halbschematische Darstellung der Formveränderungen der Spindel in den Reiftellungen. a Prometaphase I. b Metaphase I. c Frühe Anaphase I. d, e Mittlere Anaphase I. f Späte Anaphase I. g Telophase I. h Anaphase II. Schnitt, Feulgen. Vergr. 1500

nehmender Entfernung von der Spindelmitte etwas stärker nach außen gebogen (Abb. 24e).

Nach maximaler Verbreiterung werden zu beiden Seiten der inneren Anaphasegruppe I die Spindelfasern von der Peripherie her abgebaut; die Regionen, in denen die Spindel aufgelöst ist, sind gleichmäßig granuliert (Abb. 24e). Gleichzeitig setzt eine Streckung des zentralen Spindelbereiches ein, die zu einer langen zungenartigen Ausbuchtung nach innen und einer breiteren aber kürzeren Ausbuchtung nach außen führt (Abb. 24f). Nach Beendigung dieser Umformung erfaßt die Auflösung auch den zentralen Spindelbereich (Abb. 24f); dem feingranulierten diskusförmigen Spindelmittelpunkt sitzen dann die beiden

Spindelhälften auf (Abb. 24f). Die beiden Spindelhälften lösen sich vom Spindelmittelkörper ab, danach werden in ihnen aus dem fädigen Material der zerfallenen Spindel der RT I die Spindelfasern für die RT II aufgebaut.

Die periphere Spindel der RT II ist kurz und breit (Abb. 16c); die innere Spindel zeigt eine deutliche Anaphasestreckung (Abb. 16c, Abb. 24h). Der Spindelmittelkörper dehnt sich in der Anaphase II weiter seitlich aus und berührt in der Telophase II das Chorion. Er trennt die periphere Spindel vom Ei ab. $\frac{1}{2}$ Std nach Auflösung der Spindeln der RT II wird die Begrenzung des Spindelmittelkörpers undeutlich, nach weiteren 30 min ist er vollkommen abgebaut.

Die ausnahmsweise vorkommende schräge Lage der Spindellängsachse in der RT I bedingt eine seitlich schräge Ausbauchung der inneren Spindelhälfte und eine seitliche Verlagerung des peripheren Spindelpols (Abb. 24g). Dieses führt zur Einordnung der peripheren Spindel der RT II parallel zum Chorion und verursacht eine schiefe Lage der inneren Spindel in der RT II (Abb. 24h).

Die bei *Pales pratensis* in der Metaphase I vorhandenen seitlichen Ausbauchungen (Abb. 15a, b) werden durch die Anaphasestreckung der Spindel ausgeglichen (Abb. 15c). Ein Spindelmittelkörper wird nicht ausgebildet.

Bei *Tipula lateralis* ist die Spindel kurz nach Auflösung der Karyosphäre ellipsenförmig (Abb. 17b), bis zur Metaphase hat sie sich stark verkürzt und verbreitert (Abb. 17c, d, f). Der in der Telophase I bei *Tipula lateralis* auftretende Spindelmittelkörper ist kreisrund, in ihm treten radiäre Strahlen auf, die über seine Begrenzung hinaus weit in das umgebende Plasma reichen (Abb. 18a). Aus den beiden Spindelhälften werden direkt die Spindeln der 2. Reifeteilung (Abb. 18b, c, d, e). Der runde Spindelmittelkörper dehnt sich in der RT II seitlich aus und wird durch die Spindeln eingebaut (Abb. 18b, c, d). Reste der von ihm ausgehenden Strahlung sind bis zur späten Anaphase II neben der peripheren Spindel vorhanden (Abb. 18b, c, d).

In einem Fall konnte eine separate Spindel der beiden univalenten Geschlechtschromosomen beobachtet werden (Abb. 17f), die wahrscheinlich durch Abspalten eines peripheren — die Geschlechtschromosomen enthaltenden — Spindelbereiches in der Prometaphase entstanden ist, da der Aufbau einer geordneten Spindel durch 2 nicht verbundene homologe Univalente kaum möglich sein dürfte; denn hier fehlt die Korientierung der Kinetochoren des Bivalents zu den Centren, die für den Aufbau einer geordneten Spindel wohl notwendig ist.

Bei *Tipula oleracea* hat die Spindel bis zur späten Anaphase Tonnenform (Abb. 19d), dann baucht sie sich in der Äquatorialebene seitlich stark aus (Abb. 19e, f), womit eine starke Streckung der polnahen

Spindelbereiche einhergeht (Abb. 19e). Die innere Spindelhälfte löst sich in der Telophase I vom runden Spindelmittelkörper ab und bildet die innere Spindel der RT II (Abb. 19i), während die periphere Hälfte mit dem Spindelmittelkörper verbunden bleibt (Abb. 19g, h, i). Der innere dem Spindelmittelkörper anliegende Teil weist in der Metaphase II keine Spindelfasern auf und ist mit kurzen ungeordneten fädigen Struk-

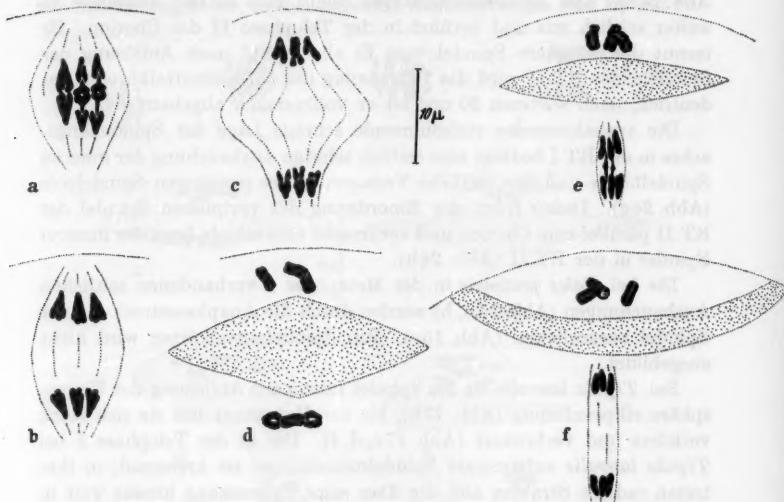


Abb. 25a-f. *Tipula caesia*. Formveränderungen der Spindel in der RT I und II. Halbschematisch. a Metaphase I. b Anaphase I. c Telophase I. d Metaphase II. e Anaphase II. f Telophase II. Schnitt, Feulgen. Vergr. 1500

turen erfüllt (Abb. 19g, h). Die Kinetochoren der Dyaden liegen zu diesem Zeitpunkt am Übergang vom unregelmäßig strukturierten inneren zu dem Faserstruktur aufweisenden äußeren Spindelteil. Nach der Trennung der Chromatiden wandert ein haploider Satz in der äußeren Teilspindel zum Pol, während die Schwesterchromatiden in den inneren Spindelteil gelangen und keine Anaphasebewegung ausführen (Abb. 19g, h). In der Telophase II schreitet der Abbau der Spindelfasern vom inneren Spindelteil zum äußeren Pol fort.

Tipula paludosa hat eine breite Tonnenspindel (Abb. 20a), die sich bis zur Telophase streckt (Abb. 20g) und dann in der alten Äquatorialebene taillenartig einschnürt (Abb. 20g). Nach Auflösung der Spindelfasern in diesem Bereich entstehen 2 Teilspindeln, die die Spindeln der RT II darstellen.

Bei *Tipula caesia* ist die Spindel anfänglich wenig breiter als die Tetraden (Abb. 13c). In der Prometaphase verbreitert sie sich um das 2—3fache und streckt sich auf das $1\frac{1}{2}$ fache (Abb. 21a, c), um sich in der Metaphase wieder auf die Ausgangslänge zu verkürzen und weiter zu verbreitern (Abb. 21d, Abb. 25a). In der Telophase baucht sie sich seitlich aus (Abb. 25c) und wird nach Umordnung der inneren Dyadengruppe zur Metaphase II in den polnahen Regionen abgebaut. Die beiden Chromosomengruppen liegen danach außerhalb des rhombischen Spindelmittelpunkts (Abb. 25d). In der 2. Reifeteilung unterbleibt die Spindelbildung im Bereich der peripheren Dyadengruppe (Abb. 25e, f). Die periphere Chromosomengruppe wird durch den Spindelmittelpunkt vom Ei abgetrennt (Abb. 25f). Die Spindel um die innere Dyadengruppe wird neu aufgebaut.

F. Diskussion der Ergebnisse

I. Die Nukleinkörper

Die Bildung der Nukleinkörper und ihre Beziehung zum Heterochromatin

Extrachromosomale feulgenpositive Körper sind in tierischen und pflanzlichen Zellen verschiedenster Entwicklungsphasen beschrieben worden. Die Herkunft des Materials, das diese Körper aufbaut, ist in den meisten Fällen ungeklärt. Bei dem klassischen Beispiel des Ringkörpers in den Differentialmitosen der Oogenese von *Dytiscus* hat BOVERI (1904) zu begründen versucht, daß — entsprechend der Diminution der Chromosomenabschnitte in den Somastammzellen der Ascarinen — Chromosomenteile abgestoßen werden, die sich zu dem Ring vereinigen. Diese Ansicht wird neuerdings auch von PAULSON (unveröffentlicht, diskutiert von SWIFT 1953) vertreten. Der geringe Größenunterschied der Chromosomen der primären und sekundären Oogonien läßt es jedoch als unmöglich erscheinen, daß das gesamte Material des Ringkörpers vorher Bestandteil der Chromosomen gewesen ist (BAUER 1953). Vielmehr kann aus der Beschreibung von GÜNTHER (1910) geschlossen werden, daß sich der Ringkörper aus einer großen Anzahl Chromatingranula zusammensetzt, die in der Prophase von den Chromocentren frei werden. Vermutlich handelt es sich hier um eine Vermehrung von DNS, die unabhängig von der DNS-Synthese für die Chromosomenreduplikation erfolgt, ähnlich den Vorgängen, die für zahlreiche andere Objekte beschrieben sind, wie z. B. in den Kernen der Speicheldrüse von *Helix aspersa* (LEUCHTENBERGER und SCHRADER 1952). Hier steigt die DNS-Menge während des Sekretionseyclus bis auf den 30fachen Wert der diploiden Zellen an, um dann während der Sekretionsphase wieder auf den diploiden Wert abzusinken. Eine ähnliche Beziehung zwischen der Produktion extrachromosomaler DNS und der Sekretionsbildung scheint in

den Drüsenzellen von *Drosera rotundifolia* (ROSENBERG 1899, KONOPKA 1930), in den Tapetumzellen von *Trillium erectum* und *Lilium henryi* (SPARROW und HAMMOND 1947) und anderen Pflanzenarten (COOPER 1952) und gelegentlich bei menschlichen Leukocyten (LA COUR 1944) vorzuliegen. Außerdem treten extrachromosomal feulgenpositive Körper in wachsenden Zellen auf; so in den Krötencytten, wo sie cyclisch von den heterochromatischen Regionen der Lampenbürstenchromosomen abgestoßen werden (PAINTER und TAYLOR 1942). In anderen Fällen ist die Beziehung zwischen der Produktion extrachromosomal DNS und Funktion der Zelle nicht so klar ausgeprägt. Das gilt z.B. für die feulgenpositiven Grana in den Furchungsmitsosen von *Cyclops strenuus* (STICH 1954), deren Entstehung als eine Begleiterscheinung der Kerntätigkeit während der Differenzierung gedeutet wird. Ähnliche Befunde sind von MOORE (1952) erhoben worden, der während der Differenzierung der Gewebe haploider und diploider *Rana pipiens*-Keime starke Abweichungen von den zu erwartenden DNS-Werten fand.

Obgleich die Befunde von LEUCHTENBERGER und SCHRAEDER (1952) von SWIFT (1953) nicht bestätigt werden konnten, der Polyploidiereihen in den Kernen der Speicheldrüse von *Helix aspersa* feststellte, sprechen die in zahlreichen tierischen und pflanzlichen Zellen verschiedenster Entwicklungsphasen auftretenden extrachromosomal feulgenpositiven Körper deutlich für eine DNS-Synthese, die nicht am Aufbau der Chromosomen beteiligt ist, sondern mit der Kernfunktion korreliert ist.

Ein eindeutiges Beispiel hierfür sind die NK der Tipuliden, für die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß sie nicht Chromosomenteile, sondern Stoffprodukte des Kernes darstellen. Für ihre Bildung an den heterochromatischen Geschlechtschromosomen oder an den heterochromatischen Regionen der Autosomen in der Interphase vor jeder Differenzialmitose konnten einige Gesetzmäßigkeiten aufgedeckt werden. So besteht eine deutliche Beziehung zwischen der Größe der in den einzelnen Arten ausgebildeten NK und der Länge der heterochromatischen Abschnitte. Dieser Zusammenhang tritt besonders klar bei den morphologisch gleichen NK der 3 Pales-Arten hervor, die, entsprechend der übereinstimmenden Länge ihrer heterochromatischen Geschlechtschromosomen, gleich groß sind. Weiterhin sind morphologisch vergleichbare NK bei Arten mit längeren heterochromatischen Bildungsbereichen größer als bei Arten mit kürzeren. Aber auch innerhalb der gleichen Art ist diese Korrelation während des 2.—4. Teilungsschrittes der sekundären Oogenien zu verfolgen. Einer schrittweisen Abnahme der Chromosomengröße von Teilungsschritt zu Teilungsschritt geht eine bei verschiedenen Arten verschieden starke Abnahme der NK-Größe parallel.

Diese Korrelation ist aber nur bei Tieren gegeben, die sich unter optimalen Lebensbedingungen entwickeln und damit zeitlich normale

Teilungsabläufe durchmachen. Bei Tieren in schlechtem physiologischem Zustand (Hungertiere) werden die Teilungen stark verzögert. Gleichzeitig damit sind die NK bedeutend größer als in den entsprechenden Teilungsschritten des zeitlich normalen Teilungsablaufs; auch verlieren sie dabei meistens ihre artspezifische Form. Hieraus kann geschlossen werden, daß die DNS-Synthese für den NK-Aufbau getrennt von der Reduplikation der Chromosomen abläuft und daß die Menge der produzierten NK-DNS von der Dauer des Interphasestadiums abhängt. Die konstante Größe der NK in vergleichbaren Teilungsschritten verschiedener Ei-anlagen des gleichen Individuums würde dementsprechend den gleichen zeitlichen Ablauf voraussetzen.

Für den Produktionszyklus der feulgenpositiven Körper der Tipuliden kann vielleicht ein Zusammenhang mit plasmatischen Synthese-Prozessen angenommen werden, die vor jeder differentiellen Zellteilung, die zur Abgliederung einer Nährzelle führt, in den Oocytenstammzellen ablaufen müssen. Im übrigen stellt die NK-Bildung ein augenfälliges Beispiel für die unterschiedliche Funktion homologer Chromosomenabschnitte (Schwesterchromatiden) in verschiedenen differenzierten Zellen dar und kann mit den von BEERMANN (1952a, 1952b) und MECHELKE (1953) beschriebenen Strukturmodifikationen in homologen Abschnitten der Riesenchromosomen in verschiedenen Geweben bzw. verschiedenen differenzierten Teilen eines Organs, verglichen werden, die auf einer differentiellen Abstimmung der Genaktivität in Zellen verschiedener Funktion beruhen. Die unterschiedliche Funktion äußert sich hier in dem auf die Oocytenstammzellen beschränkten NK-Aufbau; an den homologen Abschnitten in den von den Oocytenstammzellen abgetrennten Nährzellen tritt ein Nukleolus auf. Für die diploiden Kerne dieser beiden Zelltypen dürfen somit ungleiche DNS-Mengen mit Bestimmtheit angenommen werden.

Die Untersuchungen über den chemischen Aufbau der extrachromosomalen feulgenpositiven Körper haben erst begonnen. Ihre positive Feulgen-Reaktion und Absorption bei 2537 und 2650 Å zeigen das Vorhandensein von DNS an; die Absorption bei 2804 Å beweist, daß ebenfalls Proteine in ihnen enthalten sind (SPARROW und HAMMOND 1947). Für den Ringkörper von *Dytiscus* beschreibt URBANI (1950), daß sie sich aus DNS und RNS zusammensetzen. Der Anteil der beiden Nuklein-säuren ändert sich im Laufe der differentiellen Zellteilungen. Zunächst überwiegt die DNS, später die RNS.

Im Gegensatz zu den strukturlosen gleichartigen feulgenpositiven Körpern in den Zellen der verschiedensten Entwicklungsphasen, die vermutlich aus Nukleoproteiden einfacher Art bestehen, kann aus dem differenzierten Aufbau der NK der Tipuliden eine komplexere chemische

Zusammensetzung vermutet werden. Die artspezifisch verschiedene Form und Struktur der NK setzt wohl das Vorhandensein höhermolekularer Nukleoproteide als Bauelemente der NK voraus.

Die Beziehung der Nukleinkörper zum Differenzierungsvorgang

Beziehungen zu den Differenzierungsvorgängen, die in der Oogenese von *Dytiscus* ablaufen, läßt das Verhalten der Ringkörper in den differentiellen Zellteilungen erkennen (GÜNTHER 1910). Das extrachromosomale feulgenpositive Material, das in der Prophase des 1. Teilungsschrittes der sekundären Oogenen im Kern auftritt, umschließt in der Metaphase ringartig die Spindel und wandert in der qualitativ und quantitativ ungleichen Plasmateilung in der Anaphase stets in die größere Schwesterzelle. Auch in der 2., 3. und 4. differentiellen Zellteilung ordnet sich das feulgenpositive Material ringartig um die Spindel an und gelangt nach dem Abtrennen einer kleinen Nährzelle in jeder Anaphase wieder in die große Zelle zurück. Nach Ablauf der 4 differentiellen Zellteilungen liegen dann 15 kleine Nährzellen neben einer großen Zelle vor, die die definitive Oocyte darstellt und den Ringkörper enthält.

Bei diesen Differenzierungsvorgängen dürfte die Entscheidung darüber, welche Zelle zur Oocyte wird, wohl kaum durch die Verteilung des Ringkörpers gefällt werden. Die Differenzierung wird vielmehr sicher durch die plasmatische Polarität bedingt, die sich in der ungeteilten sekundären Oogenie zu erkennen gibt. Die Differentialmitosen führen eine Trennung ungleicher Plasmen herbei, und das Verhalten des Ringkörpers ist als Indikator für diesen Vorgang anzusehen.

Bei den Tipuliden sind die Verhältnisse in den Differentialmitosen der sekundären Oogenen zwar nicht so übersichtlich, lassen sich aber mit den Vorgängen bei *Dytiscus* vergleichen. Wie bereits oben beschrieben wurde, treten in den meisten Arten die NK erst im 2. Teilungsschritt der sekundären Oogenen auf und erscheinen auch im 3. und 4. Teilungsschritt immer in 2 benachbarten Zellen. Aus der parallelen Anordnung der Spindellängsachsen und der gleichgerichteten Anaphasebewegung der NK in den beiden Zellen im 2., 3. und 4. Teilungsschritt kann auf eine gleichartige plasmatische Differenzierung in diesen beiden Zellen geschlossen werden. Es kann angenommen werden, daß die NK in 2 Zelllinien durch den 3. und 4. Teilungsschritt „weitergegeben“ werden, d.h. in den beiden Kernen in der Prophase wieder aufgebaut werden, in denen die NK der vorhergegangenen Teilungsschritte abgebaut wurden.

Wie bei *Dytiscus* scheint vor jeder differentiellen Zellteilung in diesen beiden Zellen eine gleichgerichtete plasmatische Differenzierung vorzuliegen. Jede Differentialmitose stellt also auch hier eine Trennung qualitativ verschiedener Plasmen dar, wodurch in jedem Teilungsschritt von den beiden Oocytēn je eine Nährzelle abgegliedert wird und wobei

die NK in der Anaphase jeder differentiellen Teilung wieder in das Oocytenplasma zurückwandern.

Pales crocata weicht von diesem Modus insofern ab, als die NK nicht nur auf 2 Zelllinien beschränkt sind, sondern in der Prophase des 3. und 4. Teilungsschrittes in 1 oder 2 weiteren Zellen NK neu auftreten können. Dementsprechend können auch im 16zelligen Einährzellenverband bis zu 4 Zellen ein reguläres Pachytän aufweisen und somit als Oocytes angesehen werden. Das Neuaufreten von NK kann entweder durch eine gleichmäßige Verteilung der beiden Plasmasorten in der vorausgegangenen Teilung bedingt sein oder als ein Auftreten plasmatischer Differenzierung in weiteren Zellen gedeutet werden. Für letztere Interpretation würde sprechen, daß bei *P. crocata* niemals eine Zerteilung der NK und Wanderung der Teilstücke der NK zu beiden Polen im 2. und 3. Teilungsschritt beobachtet wurde, die bei einer gleichmäßigen Verteilung der Plasmen in der Anaphase zu erwarten wäre.

Anaphasische Teilung der NK kommt tatsächlich bei *T. oleracea* vor, und zwar in den Fällen, in denen schon in der Interphase vor dem 1. Teilungsschritt NK ausnahmsweise gebildet wurden. Vermutlich ist in diesen Fällen die plasmatische Differenzierung auch schon in der Prophase des 1. Teilungsschrittes vorhanden, und die Plasmateilung führt in der Anaphase eine gleichmäßige Verteilung der Plasmen herbei. Die gleichmäßige Verteilung kann vielleicht durch eine Einordnung der Spindellängsachse senkrecht zur Richtung der plasmatischen Polarität bedingt sein.

Im Fall von *Dytiscus* ist mit der Differenzierung einer bestimmten Zelle zur Oocyte nicht nur die Ausbildung des Pachytäns, sondern auch in jedem Fall die Weiterentwicklung zur definitiven Oocyte festgelegt. Bei den hier besprochenen Tipuliden dagegen können — artspezifisch verschieden — 1—4 Zellen des Einährzellverbandes die Meiose bis zum Pachytän durchlaufen. Welche von den 1—4 Oocytes zur definitiven wird, kann aus dem cytologischen Bild oder der relativen Lage nicht vorausgesagt werden. Der einfachste Fall würde dann bei *Tipula paludosa* vorliegen (BAUER 1931), wo alle 16 Zellen einer Eianlage ein Pachytän ausbilden, wo also in den Teilungen der sekundären Oogenen keine Differenzierung in Oocytes und Nährzellen erfolgt.

II. Die Meiose

a) Die Chromosomen

Das Verhalten der Chromosomen in der Oogenese der Tipuliden weicht prinzipiell nicht von ihrem Verhalten in der Spermatogenese und damit vom Normalmodus der Meiose ab. Ein Vergleich der Häufigkeit der Chiasmen in der Oogenese mit der in der Spermatogenese der unter-

suchten Arten läßt sich, wie schon oben betont wurde, nicht durchführen, weil die Chiasmenhäufigkeit in der Oogenese nicht eindeutig zu bestimmen ist. Doch kann, von dem Sonderfall *Tipula caesia* abgesehen, der Unterschied zwischen den Geschlechtern nicht allzu groß sein.

Die Meiose in den Oocyten von *Tipula caesia*, deren Chromosomen in den Spermatocyten keine Chiasmen bilden (BAUER 1956), unterscheidet sich nicht von der Meiose der übrigen Arten. Es liegt also eine Parallele zu anderen bekannten Fällen mit Ausfall des Faktorenaustausches in einem Geschlecht vor. Cytologische Untersuchungen der Reifeteilungen der Oocyten von Dipteren-Arten mit achiasmatischer Meiose im ♂ liegen für *Drosophila melanogaster* (HÜTTNER 1924, GUYÉNOT und NAVILLE 1929, 1933) und für *Drosophila subobscura* (FAHMY 1952) vor, ferner für *Calliphora erythrocephala* (HENKING 1888, STRASBURGER 1933) und *C. vomitoria* (HENKING 1892). Wegen der geringen Größe der Chromosomen bzw. der ungenügenden Technik sind diese Angaben allerdings von geringem Wert. Es scheint, daß in den Eiern von *Drosophila melanogaster* eine normale Meiose mit chiasmatisch gepaarten Bivalenten abläuft, während bei *Drosophila subobscura* die Bivalente keine Chiasmen erkennen lassen, obgleich Faktorenaustausch im ♀ genetisch nachgewiesen ist. Die für *Calliphora* vorliegenden Abbildungen lassen überhaupt keine in diesem Zusammenhang interessierenden Einzelheiten erkennen.

Bemerkenswert ist die große Mannigfaltigkeit im Ablauf der beiden Reifeteilungen, insbesondere das verschiedene Verhalten der Richtungskeine bei den nahe verwandten Arten. In dieser Mannigfaltigkeit kommt die große Variationsmöglichkeit im Ablauf der meiotischen Teilungen zum Ausdruck, welche in der Spermatogenese nicht in Erscheinung treten kann, weil dort normalerweise alle 4 Gonen zu Gameten umgewandelt werden.

Im Gegensatz zu den Autosomen kann für die total heterochromatischen Geschlechtschromosomen aller untersuchten Arten völliges Fehlen von Chiasmen in der Oogenese angenommen werden. Für die Spermatogenese ist der gleiche Sachverhalt bereits von BAUER (1931, 1956) und WOLF (1941) festgestellt worden. Das Fehlen von Faktorenaustausch bei den Geschlechtschromosomen würde genetisch praktisch ohne Bedeutung sein, da angenommen werden kann, daß die Geschlechtschromosomen nur noch die Geschlechtsbestimmungsfaktoren enthalten. Mechanisch wäre die Bildung von Chiasmen bei den im Pachytän total heterochromatischen Geschlechtschromosomen auch schwer zu verstehen. Darüber hinaus sprechen folgende Beobachtungen gegen eine chiasmatische Paarung der X-Chromosomen in der Oogenese:

Bei *Tipula lateralis*, *T. oleracea* und *T. paludosa* treten sie stets ungepaart aus der Karyosphäre aus und bilden in der RT I Univalente.

Obgleich es sich nicht mit Sicherheit ausschließen läßt, scheinen sie auch innerhalb der Karyosphäre nicht chiasmatisch vereint zu sein, da niemals chromosomale Verbindungsfäden zwischen den Univalenten beobachtet wurden und die Enden der Univalenten auch niemals verdickt und aufgespalten sind. Vielmehr liegen die Chromatiden der aus der Karyosphäre austretenden Univalenten stets eng zusammen, die Schenkel sind gleichmäßig spiraliert und haben meist über ihre ganze Länge Kontakt.

Dagegen treten die Geschlechtschromosomen von *Pales crocata* und *P. pratensis* in den meisten Fällen als scheinbar normale Bivalente aus der Karyosphäre aus. Doch kann diese Paarung nicht auf Chiasmenbildung beruhen, da die Geschlechtschromosomen ausnahmsweise auch in stark spiraliertem Zustand noch zu einem Bivalent zusammentreten. Während unmittelbar nach Auflösung der Karyosphäre gelegentlich univalente Geschlechtschromosomen vorzufinden sind, treten solche in der späten Prometaphase und Metaphase I niemals mehr auf. Außerdem sprechen die im speziellen Teil ausführlich beschriebenen, in ungefähr 40 bzw. 60% beobachteten atypischen Paarungskonfigurationen der Geschlechtschromosomen bei *Pales crocata* und *P. pratensis* gegen eine chiasmatische Paarung. Weitere Argumente sind das Fehlen von Chiasmenlöchern und das Ausbleiben der Chromatidenspreizung in den distal des Paarungsbereiches gelegenen freien Chromosomenenden. Demnach liegt bei den beiden Arten eine reine Kontaktpaarung vor, die auf bestimmte terminale Teilstücke der langen Schenkel beschränkt ist, wie es z.B. für alle Chromosomenpaare in der Spermatogenese von *Olfersia bisulcata* beschrieben worden ist (COOPER 1944).

b) Die Spindel

Bei den Tipuliden ist, wie es im speziellen Teil aufgezeigt wurde, eine erhebliche Mannigfaltigkeit im Bau und Verhalten der Spindel vorhanden. Das Nebeneinander-Vorkommen von Arten mit einfacher Tonnenspindel und Arten mit Spindelmittelpunkt innerhalb verschiedener kleinerer Verwandtschaftsgruppen spricht gegen eine monophyletische Entwicklung der Spindelform in der Familie. So ist innerhalb der Gattung *Pales* z.B. bei *P. crocata* ein Spindelmittelpunkt ausgebildet, während er bei *P. pratensis* fehlt. In der oleracea-Gruppe tritt ein Spindelmittelpunkt bei *Tipula oleracea* auf, ist aber bei *T. paludosa* nicht vorhanden. Neben den beiden Extremen sind für andere Arten Zwischenformen charakteristisch (*Pales pratensis*). Gegen eine monophyletische Entwicklung der einen Spindelform aus der anderen spricht weiterhin, daß die beiden Spindeltypen in gleicher Weise nebeneinander in mehreren anderen Insektenordnungen auftreten. In der Tabelle 5 sind einige Arten mit Spindelmittelpunkt aufgeführt, für einige von ihnen ist ein solcher auch in der RT II beschrieben worden.

Tabelle 5. Vorkommen von Spindelmittelkörpern bei Insekten

Ordnung	Species	RT I	RT II	Literatur
Diptera	<i>Calliphora erythrocephala</i> MEIG.	+		HENKING 1888, STRASBURGER 1933
	<i>Musca vomitoria</i> L.	+		HENKING 1892
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i> L.	+		HENKING 1892
	<i>Leucoma salicis</i> L.	+		HENKING 1892
	<i>Pieris brassicae</i> L.	+		HENKING 1890
Coleoptera	<i>Agelastica alni</i> L.	+	+	HENKING 1892
	<i>Tenebrio molitor</i> L.	+		HENKING 1892
	<i>Adimonia tanaceti</i> L.	+		HENKING 1892
	<i>Gastroides polygoni</i> L.	+		HENKING 1892
	<i>Lampyris splendidula</i> L.	+	+	HENKING 1892
	<i>Donacia sericea</i> L.	+		HENKING 1892
Hymenoptera	<i>Lasius niger</i> L.	+		HENKING 1892
Heteroptera	<i>Pyrrhocoris apterus</i> L.	+	+	HENKING 1892

Der Zeitpunkt der Ausbildung, die Feinstruktur, die Form und Größe des Spindelmittelkörpers sind auch hier von Art zu Art verschieden. Andererseits treten charakteristische Modifikationen des Spindelmittelkörpers in ganz verschiedenen Verwandtschaftsgruppen auf. So z.B. die Radiärstrahlung bei dem Coleopter *Agelastica alni* (HENKING 1892) und dem Dipter *Tipula lateralis* (Abb. 18a).

Genetische Untersuchungen an Arten mit einer derartig differenzierten Spindelform sowie Bastarde von Arten mit und ohne Spindelmittelkörper lassen vielleicht einmal Einblick in die genetische Bedingtheit der Art der Spindelbildung im Ei erwarten.

Zusammenfassung

1. Es wird die Oogenese von 10 Arten der Familie Tipulidae (Nemacocera, Diptera) beschrieben. Von *Pales crocata*, *Tipula oleracea*, *T. caesia* und *T. lateralis* wurden die Oogonienteilungen und Reifeteilungen im Ei; von *P. scurra*, *P. quadrifasciata*, *T. pruinosa* und *T. marginata* die Oogonienteilungen; von *P. pratensis* und *T. paludosa* die RT I im Ei untersucht.

2. Der Chromosomenbestand von *Tipula caesia* und *T. pruinosa* ist $n=3$; der der anderen beschriebenen Arten $n=3+X(Y)$. Die Autosomen sind bei allen Species submediokinetisch; die Geschlechtschromosomen subtelokinetisch, bei *T. lateralis* submediokinetisch.

3. Das Verhalten der Autosomen in den Reifeteilungen aller Arten (auch von *T. caesia* mit achiasmatischer ♂-Meiose) weicht vom Normalschema der Meiose nicht ab. Sie sind bei allen Arten chiasmatisch gepaart. Die Zahl der Chiasmen je Bivalent ist 1—2.

4. Die Geschlechtschromosomen zeigen bei allen Arten ein abweichendes Verhalten. Sie sind bei *P. crocata* und *P. pratensis* in kurzen

subterminalen Paarungssegmenten der langen Schenkel achiasmatisch vereinigt; bei *Tipula lateralis*, *T. oleracea* und *T. paludosa* in der RT I stets als Univalente vorhanden. Da die Geschlechtschromosomen dieser 5 Arten auch in der Spermatogenese stets ungepaart vorliegen, fehlt diesen Arten Faktorenaustausch der Geschlechtschromosomen in beiden Geschlechtern.

5. Die bei *Tipula paludosa* auftretenden Überzähligen werden in der Anaphase I zufällsgemäß verteilt.

6. Die beiden Reifeteilungen im Ei folgen direkt aufeinander, ein Interkinese-Ruhekernstadium wird nicht eingeschaltet. Die periphere Dyadengruppe teilt sich bei einigen Arten normal, bei anderen Arten unterbleibt ihre Teilung in der RT II.

7. Die Spindel ist bis zur Metaphase I bei allen Arten tonnenförmig. Nach anaphasischer Verlängerung lösen sich die Spindelfasern in der Metaphaseebene auf. Die Halbspindeln stellen die Spindeln der RT II dar. Bei einigen Arten entsteht durch Verbreiterung der Spindel in der Anaphase I ein rhombischer Spindelmittelpunkt. Die Spindeln der RT II werden hier direkt von den Spindelhälften der RT I gebildet, bzw. partiell oder ganz neugebildet.

8. In den Teilungen der sekundären Oogonien treten vom 2. Teilungsschritt an feulgenpositive, extrachromosomale Körper (Nukleinkörper, NK) auf. Die Teilungen sind Differentialmitosen. Im 3. und 4. Teilungsschritt treten die NK wieder in den Zellen auf, in die sie in der vorangegangenen Telophase einbezogen wurden.

9. Trotz des regelmäßigen Abbaus der NK in der Interphase, der sich mit dem Neuaufbau der NK zeitlich nicht überschneidet, ist die Kontinuität der NK-Zellen aus ihrer Lage abzuleiten.

10. Diese Zellen, gewöhnlich 2, bei einer Art 1—4, erweisen sich nach der letzten Differentialmitose durch Bildung eines Pachytäns als Oocytes. Nur eine von ihnen wird zur definitiven Oocyte; die andere oder anderen werden zu Nährzellen.

11. Anzahl und Form der NK sind von Art zu Art charakteristisch verschieden. Die NK werden am Heterochromatin, entweder den Geschlechtschromosomen oder den heterochromatischen Bereichen der Autosomen, aufgebaut.

12. Es besteht eine Korrelation zwischen der Länge der heterochromatischen Bildungsbereiche und der Größe der NK. Ferner ist die NK-Größe von der Dauer des Interphasestadiums abhängig.

13. Aus dem Auftreten der NK muß auf eine von der Chromosomen-reduktion unabhängige DNS-Synthese geschlossen werden, die zugleich Ausdruck einer verschiedenen Funktion homologer Chromosomen (Schwesterchromatiden) in plasmatisch differenten Zellen ist.

Literatur

BAUER, H.: Die Chromosomen von *Tipula paludosa* MEIG. in Eibildung und Spermatogenese. *Z. Zellforsch.* **14**, 138—193 (1931). — Die Histologie des Ovars von *Tipula paludosa* MEIG. *Z. Zool.* **143**, 53—76 (1932). — Die FEULGENSche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* **15**, 225—247 (1932). — Die wachsenden Oocytenkerne einiger Insekten in ihrem Verhalten zur Nuklealfärbung. *Z. Zellforsch.* **18**, 254—298 (1933). — Die Chromosomen im Soma der Metazoen. (Referat.) *Verh. der Dtsch. Zool. Ges.* Freiburg 1952. *Zool. Anz. Suppl.* **1953**, 252—268. — Die Spermatocytenteilungen der Tipuliden. I. Vergleichende Übersicht des Chromosomenverhaltens. *Chromosoma* **7** (1956, im Druck). — BAYREUTHER, K.: Extrachromosomal feulgenpositive Körper (Nukleinkörper) in der Oogenese der Tipuliden. *Naturwiss.* **39**, 71 (1952). — BEERMANN, W.: Chromosomenstruktur und Zelldifferenzierung in der Speicheldrüse von *Trichocadius vitripennis*. *Z. Naturforsch.* **7b**, 237—242 (1952a). — Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organendifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* **5**, 139—198 (1952b). — BOVERI, TH.: Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns, S. 1—130. Jena: Gustav Fischer 1904. — COOPER, D. C.: The transfer of desoxyribose nucleic acid from the tapetum to the microsporocyte at the onset of meiosis. *Amer. Naturalist* **86**, 219—229 (1952). — COOPER, K. W.: The nuclear cytology of the grass mite, *Pediculopis graminum* (REUT.) with special reference to karyomorokinesis. *Chromosoma* **1**, 51—103 (1939). — Analysis of meiotic pairing in *Olfersia* and consideration of the reciprocal chiasmata hypothesis of sex chromosome some conjunction in male *Drosophila*. *Genetics* **29**, 537—568 (1944). — FAHMY, O. G.: The cytology and genetics of *Drosophila subobscura*. VI. Maturation, fertilization and cleavage in normal eggs and in the presence of the cross-over suppressor gene. *J. Genet.* **50**, 486—506 (1952). — FROLOWA, S. L.: Cytologie der künstlichen Parthenogenese bei *Bombyx mori* L. *Biol. Zurn.* **4**, 275—308 (1935). — GÜNTHER, TH.: Die Eibildung der Dytisciden. *Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog.* **30**, 1—72 (1910). — GUYÉNOT, E., et A. NAVILLE: Les chromosomes et la réduction chromatique chez *Drosophila melanogaster*. *Cellule* **39**, 27—82 (1929). — Les bases cytologiques de la théorie du "crossing-over". Les premières phases de l'ovogénèse de *Drosophila melanogaster*. *Cellule* **42**, 211—230 (1933). — HENKING, H.: Die ersten Entwicklungsvorgänge im Fliegenei und freie Kernbildung. *Z. Zool.* **46**, 289—336 (1888). — Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten. *Z. Zool.* **49**, 503—564 (1890). — Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten. III. Spezielles und Allgemeines. *Z. Zool.* **54**, 1—275 (1892). — HUETTNER, A.: Maturation and fertilization in *Drosophila melanogaster*. *J. Morph. a. Physiol.* **39**, 249—259 (1924). — KLINGSTEDT, H.: Digametie beim Weibchen der Trichoptere *Limnophilus decipiens* KOL. *Acta zool. fenn.* **10**, 1—69 (1951). — KONOPKA, K.: Die Rolle des Kerns bei Verdauung, Sekretion und Reizbewegung der *Drosera rotundifolia*. *Schr. Königsberg. gelehrt. Ges., Naturwiss.* Kl. **7**, 13—112 (1930). — LA COUR, L. F.: Mitosis and cell differentiation in the blood. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect. B* **62**, 73—84 (1944). — LEUCHTENBERGER, C., and F. SCHRADER: Variation in the amounts of desoxyribose nucleic acid (DNA) in cells of the same tissue and its correlation with secretory function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **38**, 99—105 (1952). — MANNHEIMS, B.: Die Fliegen der paläarktischen Region. 15. *Tipulidae*. *Liefg.* **167**, 170. Stuttgart: 1951, 1952. — MECHELKE, F.: Reversible Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomen von *Acritotopus lucidus*. *Chromosoma* **5**, 511—543 (1953). — MOORE, B. C.: Desoxyribose nucleic acid in embryonic diploid and haploid

tissues. *Chromosoma* **4**, 563—576 (1952). — PAINTER, T. S., and A. N. TAYLOR: Nucleic acid storage in the toad's egg. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **28**, 311—317 (1942). — RIS, H., and R. KLEINFELD: Cytochemical studies on the chromatin elimination in *Solenobia* (*Lepidoptera*). *Chromosoma* **5**, 363—371 (1952). — ROSENBERG, O.: Physiologisch-cytologische Untersuchungen über *Drosera rotundifolia*. *Diss. Bonn* 1899. — SEILER, J.: Das Verhalten der Geschlechtschromosomen bei Lepidopteren. *Arch. Zellforsch.* **13**, 159—269 (1914). — Geschlechtschromosomenuntersuchungen bei Psychiden. IV. *Z. Vererbungslehre* **31**, 1—99 (1923). — SLIFER, E. H.: Removing the shell from living grass-hopper eggs. *Science* **102**, 282 (1945). — SPARROW, A. H., and M. R. HAMMOND: Cytological evidence for the transfer of desoxyribose nucleic acid from nucleus to cytoplasm in certain plant cells. *Amer. J. Bot.* **34**, 439—445 (1947). — STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. Ein Beitrag zur Mechanik der Mitose. *Chromosoma* **6**, 199—236 (1954). — STRASBURGER, E. H.: Über den Formwechsel des Chromatins in der Entwicklung der Fliege *Calliphora erythrocephala* MERGEN. *Z. Zellforsch.* **17**, 83—117 (1933). — SWIFT, H.: Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Internat. Rev. of Cytol.* **2**, 78—126 (1953). — URBANI, E.: La massa di Giardina dell'ocite di *Dytiscus marginalis* L. *Riv. Biol.* **42**, 413—442 (1950). — WOLF, E.: Die Chromosomen in der Spermatogenese einiger Nematoceren. *Chromosoma* **2**, 192—246 (1941).

Dr. KLAUS BAYREUTHER, Wilhelmshaven,
Max-Planck-Institut für Meeresbiologie

From the Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University, Cracow, Poland

CINE-MICROGRAPHIC STUDIES ON MITOSIS IN ENDOSPERM

II. CHROMOSOME, CYTOPLASMIC AND BROWNIAN MOVEMENTS*

By

A. BAJER and J. MOLÈ-BAJER

With 35 figures in the text

(*Ein eingegangen am 8. März 1955*)

Contents

	Page
I. Introduction	558
II. Material and methods	559
III. Observations	560
1. Chromosome movements	560
a) Chromosome movements before contraction stage	560
b) Stage contraction of mitotic	561
c) Metakinesis and metaphase	566
d) Velocities in contraction stage, metakinesis and metaphase	575
e) Anaphase	576
f) Endomitosis	583
2. Cytoplasmic movements	584
3. Brownian movements	589
IV. Discussion	595
1. Chromosome movements	595
2. Cytoplasmic movements	601
3. Brownian movements	602
Summary	604
References	605

I. Introduction

In the voluminous amount of papers, old and new, which deal with the problem of mitosis, only a few are strictly concerned with the mechanism of cell division and chromosome movement. Also most of even the experimental work was done on fixed material, which, though unavoidable in many cases, may lead to erroneous conclusions, especially if an exact analysis of chromosome movement or its mechanism is considered. It is evident, however, that many such papers elucidated important and key problems in the field of chromosome mechanism (SCHRADER 1953). The studies of cells in a fixed state must to a certain

* A short part of the film with whose analysis the present paper deals was projected at the VIII. International Botanical Congress—Paris 1954 as an illustration of the presented communication (BAJER 1954b).

These studies have been made possible thanks to a grant from the Polish Academy of Sciences, which is gratefully acknowledged.

degree be static and cannot give a full and exhaustive picture of the course of mitosis, because they may *describe the results but not the ways* leading to them, and the ways may be often quite unexpected.

As a result the normal course of mitosis in the living cell is not exactly known, though it is often supposed to be described in all details. The aim of this paper was to study some details of mitosis in the living state. In the first paper of this series (BAJER 1954b) the cine-micrographic method was used to study mitosis in *Haemanthus* endosperm, and the method of experimental flattening of plant mitotic spindles was used for the first time.

In the previous paper as a result of the film analysis the exact moment in which the *kinetochores fix themselves to the spindle* i.e. in which they begin to lead the chromosomes in their movement, was found and it was proved that *in metakinesis two "forces" acting simultaneously towards the pole and towards the plate exist*. Also *in metakinesis the movement of some chromosomes to the pole and their return to the plate was observed*.

The word "force" is often used in this and the previous paper to denote the cause of the observed state, movement etc. It is evident that if a change of position is observed it is the result of an acting force. This term and also the term "pulling" are used in purely descriptive sense, and only in the discussion some suggestions on their nature will be found.

In this paper the authors made a comparative analysis of mitosis in plants with chromosomes of different dimensions, shapes, and numbers—i.e. with different mechanical conditions in the spindle and the cell and different durations of mitosis.

II. Material and methods

Endosperm of *Colchicum autumnale*, *Iris aphylla*, *Leucojum aestivum* and partly *L. vernum*, *Clivia cyathiflora* and *Haemanthus Katharinae* were used. Methods of handling the endosperm *in vivo* were similar to those described in the previous paper (BAJER 1954a) except that an oxygen atmosphere was not used. A description of the methods with all improvements is given elsewhere (BAJER 1955), an exhaustive discussion of the method has previously been published (BAJER and MOLÉ-BAJER 1954) and a simple method for studies on the influence of chemical substances on mitosis in endosperm has been given by MOLÉ-BAJER (1955). Cells of normal dimensions as well as experimentally flattened ones were used for all plants; the medium consisted of agar (0.4—0.5%) and glucose (for *Colchicum* 3%, *Iris* 3.5—4%, *Leucojum aestivum* 3%, *L. vernum* 3.5%, *Clivia* 3.5% and *Haemanthus* 3.5%).

A 16 mm cine camera was used with different accelerations depending on the plant species: *Colchicum* 14, *Iris* 12, *Leucojum* 8, *Clivia* 7 and 9 and *Haemanthus* 4 and 2 records per minute. The length of the whole film was about 1400 m and exact analysis was made on about 800 m. Some cells were also photographed on 35 mm film. Phase contrast equipment was used exclusively.

During analysis of the film two methods were applied: in projection and frame-by-frame. Clear notes on the methods of analysis are given by HUGHES and SWANN (1948). They discuss also the problem of grain, which appears in paper enlargements so that micrographs do not illustrate the possibilities which can be obtained. To

observe the correctness of this statement it is sufficient to compare micrographs from 35 mm film (i.e. micrographs in Fig. 16) with the other figures from 16 mm film. During the analysis the distances in the curves and velocities were measured on a small screen in the usual way. The paths of the kinetochores, chromosome arm ends, particles showing Brownian movements and direction of cytoplasm currents were directly drawn on a screen during projection at a very slow speed. This last method could only be used for cells which do not change their position during projection. It appeared that the error during the estimation of the paths etc. with this second method is much smaller.

Cells of *Haemanthus* which were in prophase were usually killed by light of high intensity. Exposure of the one record was 15 and 30 seconds (with acceleration corresponding to 4 and 2 records per minute respectively). This permitted the use of very weak light. The complete elimination of heat rays appeared also to be of great importance. The destroying influence of light on living cells is generally known. Boss (1954a) was the last to mention this action.

III. Observations

The plants studied have very small chromosomes (*Colchicum*), medium ones (*Iris*), short and thick ones (*Clivia*), long and thin ones (*Leucojum*) or very large ones with considerable differences in length (*Haemanthus*). Figs. 12, 22, 4, 30 and 8 respectively illustrate the different chromosome sets. Studies on *Colchicum* mainly concern metaphase and anaphase.

1. Chromosome movement

a) Chromosome movements before the contraction stage

In the previous papers (BAJER 1953a, b, 1954a) the process of spindle formation was described in detail. Below only the general course will be stated.

The first sign of the spindle formation is the appearance of a *clear, usually structureless, space around the nucleus*. The shape of the nuclei is often ellipsoidal. Typically the formation of a ball-shaped nucleus follows and in many—especially non-flattened—cells the nucleus changes its shape to a perfect sphere. In *Iris* this transition is not clear, because the nuclei often have the shape of a ball from very early prophase on.

The changes of chromosome position are very slow and can only be studied with the greatest accelerations. In most cases no distinct movements were observed: the chromosomes become thicker, their refraction increases, but they do not change their position, if the shifting due to the change of the shape of the nucleus is disregarded. Only in a few cases in *Clivia* a slight waving of single chromosome arms was found. These movements may be caused by Brownian movements and by structural changes of the chromosomes i.e. spiralisation. It seems probable, however, that just before the contraction stage the chromosomes take a more peripheral position, especially in *Iris* and often *Clivia*.

Large nucleoli are as a rule motionless. Their movements are impeded by chromosomes close to them. However, slight movements of small nucleoli are

evident, and the Brownian character of these movements seems to be certain. In slightly injured cells these movements are much better visible. The shape of the nucleoli is different and their substance is half-liquid. This is better proved by micrurgical experiments (BAJER 1954 unpubl., cf. also p. 583).

b) Stage of mitotic contraction (C.S.)

The mitotic contraction stage (C.S.) is the stage lasting for a few minutes prior to prometaphase (metakinesis) when the scattered chromosomes which had in late prophase formed a loose ball aggregate suddenly into a tighter central mass.

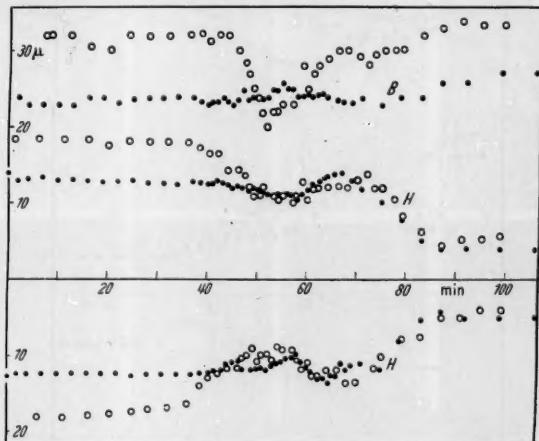


Fig. 1. Contraction stage and metakinesis in *Iris* (white circles) and *Clivia* (black circles). The diameter of the chromosome group perpendicular to the future orientation of the metaphase plate (height of the nucleus)—H, and the breadth of the nucleus—B, plotted against the time. C.S. begins after 40 mins. approximately and ends within 60 mins. when metakinesis begins. In *Iris* a sudden decrease in the diameter of the chromosome group both in a direction parallel (H) and perpendicular (B) to the spindle axis is visible—compression from all directions. After the compression H increases and then decreases when the chromosomes move to the plate. The values of B after C.S. indicate the increase in the diameter of the chromosome plate during metakinesis. *Iris*—cell No 243. In *Clivia* (cell partly flattened) C.S. is weak and only from the poles. Slight increase in the chromosome group diameter (B), when there is a decrease in *Iris*. Metakinesis similar to *Iris*. *Clivia*—cell No 326a

"In this stage the interaction between the spindle and the chromosomes begins" and "the guiding role of kinetochores in chromosome movement during mitosis first manifests" itself (BAJER 1954a, p. 403, cf. also pp. 389—390). This stage, lasting a few minutes, has a very characteristic appearance. The whole chromosome group is suddenly compressed and the course and appearance of this action depends on some factors described below. The existence of this stage in *Haemanthus* was proved and it was suggested that C.S. is of general occurrence. This was confirmed during

these studies. This stage was found in all the plants studied (*Colchicum* was not studied in this respect) and some characteristic differences—depending mainly on the special mechanical conditions—were observed. Different degrees of contraction were found in different cells, and in some cases the contraction is weak. This may happen in flattened cells and often in cells with a large quantity of starch grains present in older

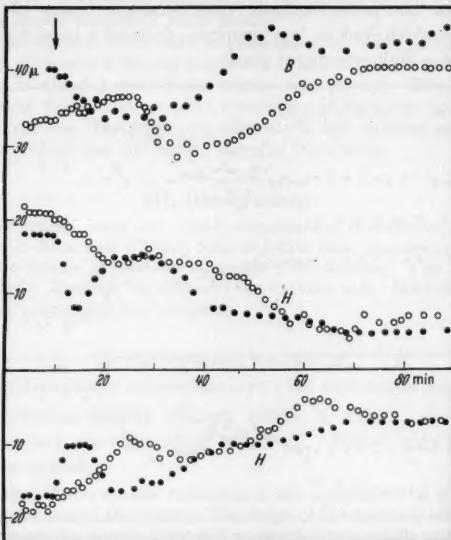


Fig. 2. Contraction stage and metakinesis in *Clivia*. Cell partly flattened—white circles (No 300) and not flattened—black circles (No 304). Beginning of C.S. indicated by the arrow. Comp. Fig. 1. In the partly flattened cell C.S. is much weaker and there is no distinct movement of chromosome arms to the poles after the compression. In cell No 300 an unusual increase in the diameter of the chromosome group is seen, and in cell No 304 this is very sudden and similar to that in *Iris* (Fig. 1). The movement of some kinetochores from this cell is given in Fig. 5.

endosperms, especially in *Leucospermum*. However, even in flattened cells in none of the cases observed was there any difficulty in recognizing the beginning of the C.S. In non-flattened and longitudinally shaped cells without vacuoles and starch grains C.S. is most distinct. The differences in appearance of C.S. are also partly caused by the shape, number and dimensions of chromosomes. It is evident that the resistance to the compression of the chromosome group composed of medium sized and thin ones such as in *Iris* is slight in comparison with that in *Haemanthus* or even in *Clivia*. Thus, two extreme modifications of C.S. occur, depending mostly on the *mechanical conditions* caused by

chromosomes. The relationship between mechanical conditions and the course of C.S. is responsible for the prevalence of different types in different species. The first type described below dominates in *Iris*, the second in other species. The division is not sharp and between these two types there are continuous transitions, which are illustrated by the figures.

First type of C.S. The compression of chromosomes which formed the ball shaped nucleus takes place *from all sides* i.e. the diameter of the nucleus decreases

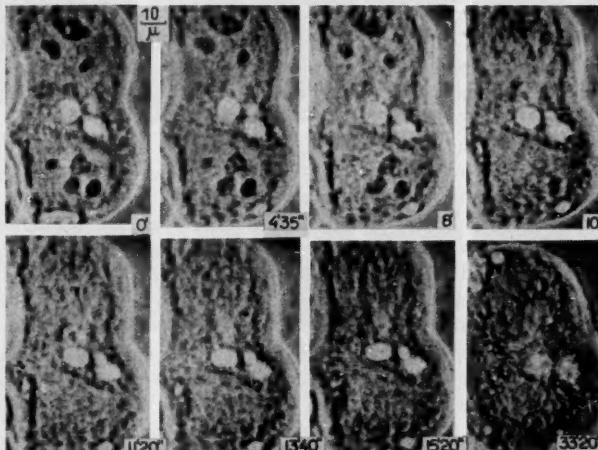


Fig. 3. Contraction stage and metakinesis in *Iris*. Time given on micrographs. Slight diminishing of the refraction coefficient of the nucleoli 8, and their sudden disappearance visible. Beginning of C.S. at 9°. The pressure from all directions is noticeable from 10' to 13'40". Cine film 16 mm. Cell No 231

in all directions (Figs. 1, 2, 3). One has a strong impression that the force causing the compression acts from all directions and not only from the poles, though the pressure from this direction is usually the strongest. Immediately after the maximal compression the volume of the space occupied by the chromosome group increases suddenly in all directions but mainly towards the poles. Metakinesis (prometaphase) begins during which the breadth of the incipient plate increases and the height decreases. The sudden change in the volume is the result of the straightening of the chromosomes arms entangled during C.S. in the direction of the poles and also by the movement of some chromosomes.

Second type of C.S. Typical C.S. in which the chromosome group is compressed mainly *from the poles*, is represented by Figs. 2 (white circles) and 4. Contrary to the course described above, the breadth of the chromosome group perpendicularly to the long axis of the spindle i.e. the breadth of the future metaphase plate, does not decrease but increases. The force at this stage acts exclusively from the poles. The beginning of metakinesis is similar in all cases.

Between these two extreme types intermediate ones are found. In *Clivia* they are shown in Figs. 1 and 2; compression from all directions similar to *Iris* (Fig. 2, back circles) and intermediate between the extremes presented in Fig. 2 is found in Fig. 1 (black circles).

In the above description the whole chromosome group i.e. the diameters of the nucleus and the forming plate were considered. The analysis of the movement of kinetochores in C.S. is difficult and is based on few observations only. It seems that the kinetochores, at least in the first moments of contraction, are pushed *parallelly to the direction of contraction*, which is *usually* the same as the long axis of the future spindle. If the breadth of the chromosome group during C.S. increases the chromosomes move also slightly transversally. The pushing of the kinetochores to the middle of the spindle is well visible in Fig. 4. During the process of pushing, some of the chromosomes quickly turn around indicating sudden unwinding. In one case a chromosome of *Clivia* made about 5 turns while moving less than $10\text{ }\mu$ and a time less than 5 mins. This cell is presented in Fig. 4, but unfortunately it is not possible to visualise the unwinding from the micrographs. The correlation between the position of the chromosome in the prophase nucleus and its movement in C.S. is seen in Figs. 6, 7, 8. The chromosomes which are in an exterior position and are the nearest to the pole (chromosome B in Figs. 6-8) are subjected to the acting force, while others which are in the middle (chromosome E) may be completely unaffected. The nearer the position of the chromosome to the pole the larger is the distance of the shoving of this chromosome during C.S., and the earlier the movement begins. *During C.S. the chromosomes move distinctly and violently without any visible action of the kinetochores and the force acts on the whole chromosome independently of whether it is the arm or the kinetochore. The chromosome movement is a passive one* i.e. the kinetochores are as yet inactive and in this respect this is the only such stage in a perfectly normal mitosis.

In this description of C.S. the straightening of the chromosome arms i.e. the increase of the area occupied by the chromosome group is also partly considered; this last part may also be regarded as prometaphase. But as there is no sharp border between metakinesis and C.S. (though it is more pronounced than that between anaphase and telophase) it is not possible to determine the exact moment of the beginning of prometaphase, and the question as to whether the kinetochores do guide the chromosomes at the end of C.S. or the beginning of prometaphase is of a purely terminological kind.

Observations on the disappearance of the nuclear membrane may throw some light on the mechanism of C.S. (cf. discussion p. 597). In some cases in *Leucocjum* the part of the nuclear membrane close to the future spindle pole disappears first, and simultaneously C.S. begins, mainly from this side and during this process the rest of the membrane gradually

disappears. Observations in *Iris* and *Clivia* are in accordance with those in *Leucojum* and they have also shown that contraction need not begin from the direction of the long axis of the future spindle. In conclusion it may be stated that the nuclear membrane disappears during

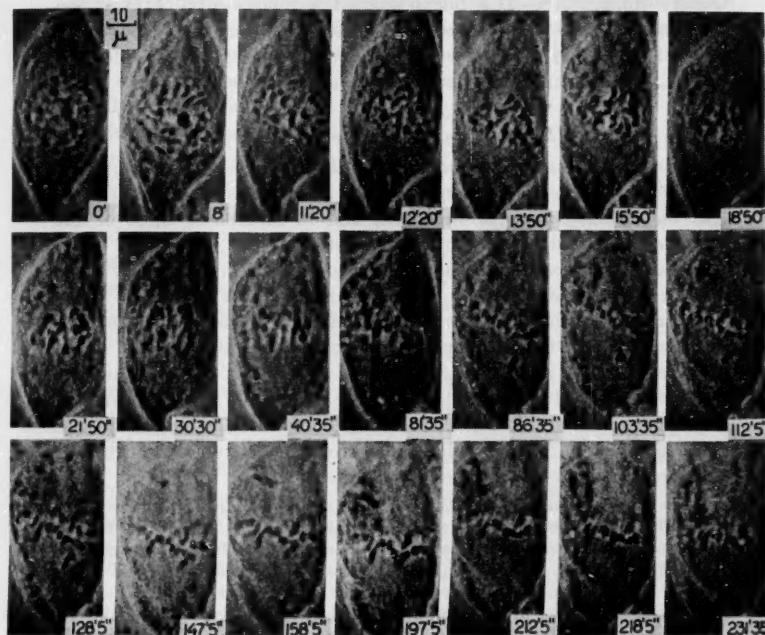


Fig. 4. Contraction stage and movement to the pole in metakinesis of *Clivia*. Time given on micrographs. Beginning of C.S. at 11'20" and three successive stages of C.S. from 12'20"—15'50". Notice the great changes in short time intervals. In metakinesis the diameter of the chromosome group parallel to the spindle axis increases. In the movement to the pole of a single chromosome at 81'35" to 128'5" the kinetochore is directed poleward; in the lower half spindle a chromosome moves simultaneously to the plate. The chromosome on the pole turns, and when moving to the plate (147'5"—231'35") the kinetochore governs its movement. Double structure of the returning chromosome is seen (147'5"—158'5").

Cell No 312. Cine film 16 mm

the compression of the chromosomes, or immediately before, though it is usually difficult to estimate the exact moment.

Nucleoli disappear also during C.S. or before it. In *Clivia* and *Haemanthus* this process is similar and it occurs usually before C.S. The process is slow, the nucleoli become fainter and fainter and, though still present during the beginning of C.S., disappear during the contraction. In *Haemanthus* only in one case (BAJER 1952 unpubl.) a

persisting nucleolus was observed in metaphase. In *Iris* and often in *Leucojum* the disappearance of the nucleoli is usually abrupt (cf. Fig. 3). They may still be visible at the beginning of C. S., though their refraction is slightly diminished. Then they disappear suddenly in a few minutes usually during C. S. This might suggest a relationship between the time of C. S. and the disappearance of nucleoli. However, analysis of about 20 cells of *Iris* indicates that they may disappear just before or during C. S. and that this correlation is only fictitious.

c) Metakinesis (prometaphase) and metaphase

The most characteristic feature of metakinesis is the simultaneous two directional movement in the spindle: the kinetochores move to the plate and the chromosome arms straighten, and in metaphase most of the arms are arranged parallelly to the spindle axis.

Kinetochoore movement. Some kinetochores in metakinesis may move to the pole instead of the plate but finally they go to the plate. As a result of prometaphase the metaphase plate is formed and the kinetochores are typically arranged in one plane, though this is not indispensable for metaphase as has been pointed out by many authors e.g. ÖSTERGREN (1949b, 1951), and many example of anaphase without metaphase plate stabilisation have become known. Some cases are also described below. However there is a strong tendency towards such an arrangement.

The question arises as to whether metaphase as a stage exists and whether there are differences between prometaphase (metakinesis) and metaphase, because between these two stages there is a continuous transition, and it is often impossible to distinguish them. In these two stages similar processes and forces seem to act, though they differ in intensity, or probably one group of processes ceases and the second begins to act. In some instances the chromosomes seem to be motionless before anaphase, but in other cells of the same plant this is not so. In this second case it may be suggested that anaphase begins after metakinesis—and it is especially suggestive in cells without metaphase plate stabilisation. The duration of metakinesis and metaphase varies in the same plant. In *Clivia* anaphase may begin 2.5—3 hrs. or only 1—1.5 hr. after C. S. From what moment one should consider the stage as metakinesis and from what as metaphase is an unsolved question. When the plate is regularly formed, but one or more chromosomes are moving to the plate, such stage is metakinesis. When the chromosomes are, or rather seem to be, motionless (for it is difficult to make measurements), such a stage may be considered as metaphase. In this paper the term metaphase is used to denote the stage in which the chromosomes have a tendency to arrange themselves in the middle of the spindle and which occurs just before the anaphase (cf. suggestions concerning the processes which take place in metakinesis and metaphase—discussion p. 599). Short duration of metaphase was also stressed by MARTENS (1927).

The results of the analysis of the paths of the kinetochores are given in Figs. 5—11. For the movements no general rules are found,

and the possibilities are diverse. Some examples are represented by Figs. 7-9. In Fig. 9 chromosomes A, K, L and some others not marked moved *the shortest and quickest* way to their future position in the plate. Others did not and the movement of F, G, H and I was strange. They move in a quite unexpected position in the plate and *not the nearest position* they could occupy in it. Similar observations were made in other cells. The paths of the kinetochores may be *parallel* to the long axis of the spindle, but usually the direction changes during the movement and movements *across the spindle* are very often found. It might be suggested that the movement across the spindle occurs in spindles in which the polarity is not yet determined; in reality, however, there is a polarity of the extremely flattened spindle, though it may not be distinct (Fig. 9). In most cases it is as plain as in the non-flattened ones.

The movements of kinetochores in metakinesis are not synchronous and simultaneous. Some chromosomes move to the plate, while others are motionless and remain in the position they reached after C.S. No correlation between the moment when the kinetochores begin to move and their position in the spindle was found. Fig. 6 illustrates a case in which kinetochore movements began nearly simultaneously, but then were interrupted. The kinetochores move, become motionless (time 80-90 mins.) and then move again. Also kinetochores situated near each other (Fig. 7 FK, EK) move simultaneously in opposite directions (Fig. 6 time 58-65 mins.).

The suggestion that *the movement of the kinetochores in metakinesis to the pole* is not exceptional (BAJER 1954a) is correct. Especially suitable for analysis were *Clivia* and *Haemanthus* in which this movement was often found. The movement to the pole may also begin just after C.S., or several minutes before the beginning of anaphase. The kinetochores may be pulled only slightly to the poles (Figs. 6-7 DK, FK), but may also migrate over a considerable distance. Between these two types of movement i.e. *over short and long distances*—there

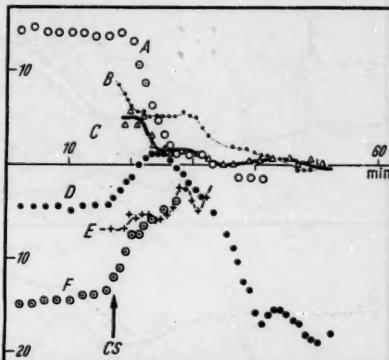


Fig. 5. The movement of kinetochores during C.S. and metakinesis in *Clivia*. The distance of kinetochores from the middle of the spindle (chosen arbitrarily) in the direction to the two poles, plotted against time. Beginning of C.S. indicated by arrow. A, F, D—cell No 300, B, C—cell 326a. The curves for C.S. in these cells are given in Figs. 1, 2. Kinetochores are pushed in the direction of the plate at slightly different moments depending on their position in the chromosome group. Oscillatory movement of E during metakinesis

is only a quantitative difference. No dependence between the position of the chromosome in the chromosome group and the movement to the pole was found and both the chromosomes *outside* the chromosome group and those *surrounded* by others and placed in the middle of the chromosome group may move to the pole. During the longer movement to the pole the kinetochores guide the chromosomes and the movement

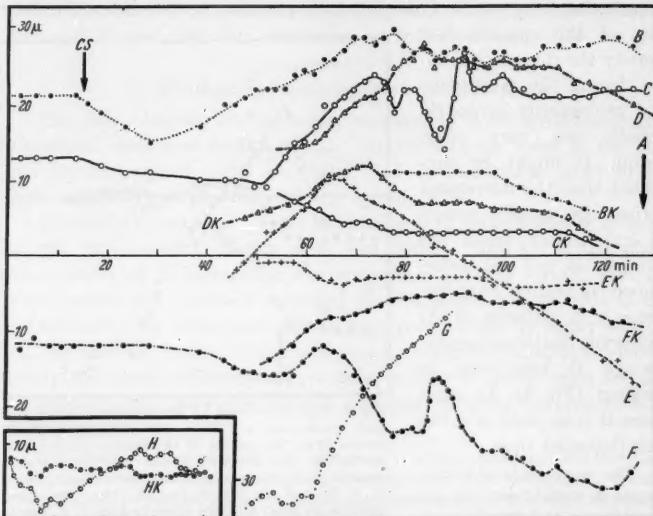


Fig. 6. Movements of kinetochores and chromosome ends in *Haemanthus* (B—G) and *Clivia* (H) in metakinesis and metaphase. Chromosome ends marked by letters B—G. Kinetochores marked by the same letter and K. The distance from the arbitrarily chosen abscissæ in the middle of the spindle (dotted line in Fig. 7), plotted against time. The movements of the chromosome ends B, C, F were measured before C.S. (arrow C.S.). Arrow A—beginning of anaphase. Compare the ways of the chromosome ends and the kinetochores with the drawings of the same cell of *Haemanthus* in Fig. 7 and micrographs in Fig. 8. In *Clivia* the movement of the chromosome arm placed in cytoplasm during metaphase. During the arm movements the kinetochore oscillates slightly. Notice that the ends of the chromosome arm in *Haemanthus* are not in cytoplasm (Fig. 8).

Haemanthus—cell No 1063. *Clivia*—No 326a

in this respect is similar to the anaphase movement (Figs. 4, 10). At the pole the chromosome turns, this turning often being preceded by shorter or longer to and fro movements, and returns to the plate with the kinetochore guiding the chromosome. The to and fro movement is connected with the turning of the whole chromosome. In the same half spindle chromosomes may move simultaneously in two directions: one travels to the pole and the second returns. In all observed cases the movements, independent of the direction, were jerky. If the chro-

mosomes move over longer distances to the pole, metakinesis is very long. Anaphase does not begin until the chromosomes are moving to the plate; it may begin if they are not in the plate, but their movement has ceased. This suggests that the anaphase release is stopped by the process of the movement.

In the movement over short distances a sudden pull is exerted on the chromosome and this occurs often *just* after C.S. (Fig. 10D). In

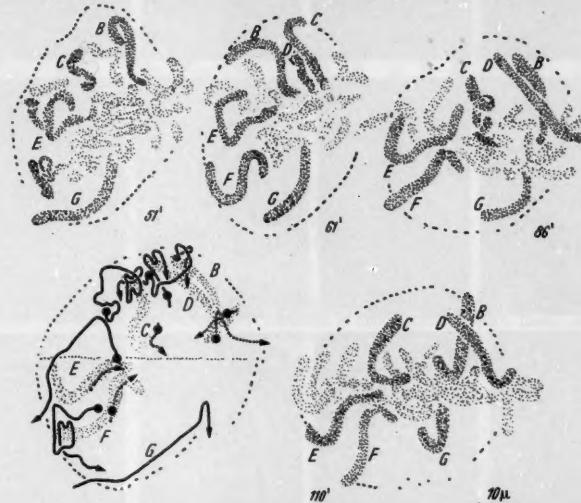


Fig. 7. Paths of kinetochores (dotted lines) and chromosome ends (continuous lines) in metakinesis of *Haemanthus*. Drawings of the cell analysed in Fig. 6—micrographs Fig. 8. The letters indicate the same chromosomes. As the cell is flattened the paths are only to a very slight degree distorted by projection and illustrate the actual ways. The black circles show the approximate moment of the beginning of the curves in Fig. 6. No circle means that no full tracing of the way could be given. The times in Figs. 6, 7 and 8 coincide approximately

this sudden jerk the arm often precedes the kinetochore and during the movement the arms are often maximally stretched and straighten to the poles. In the movement over short distances the kinetochore does not usually lead the chromosomes in their movement as it does in the movement to the poles.

When the anaphase does not begin for a long time, chromosomes in the plate usually oscillate slightly. In some cases anaphase does not begin, but "waits" for the chromosome to move to the plate, beginning a few minutes after this has reached it. Such a case is shown in Fig. 11, where the returning chromosome deforms the plate; the oscillatory movement of some kinetochores during their pushing in the plate is distinct. In other cells, however, for no visible reason the

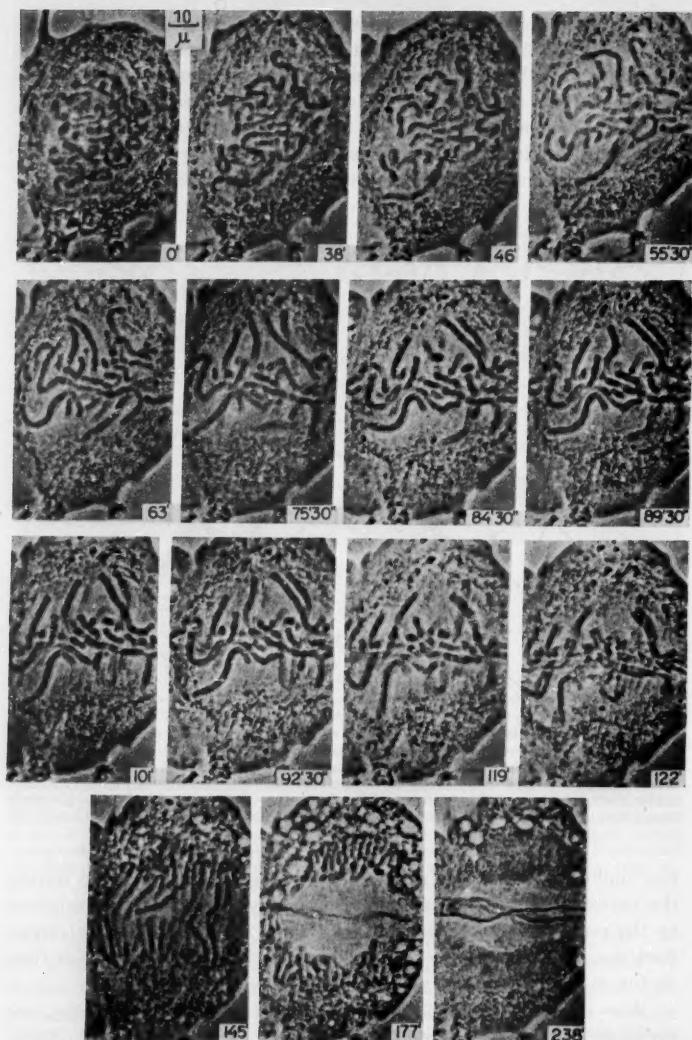


Fig. 8. Movements of chromosome arms in *Haemanthus* during metaphase plate stabilization. Time given on micrographs. 0' before and 38' after C.S. Compare with Fig. 7 the straightening of the arm F at 55'30" to 75'30", the movement to the plate 84'30" and renewed straightening, and also the sudden turn of arm C—84'30". Splitting of the chromatids before anaphase 119'. The cell wall in 238' is twisted the approximate thickness of the phragmoplast during cell wall formation is about 8 μ

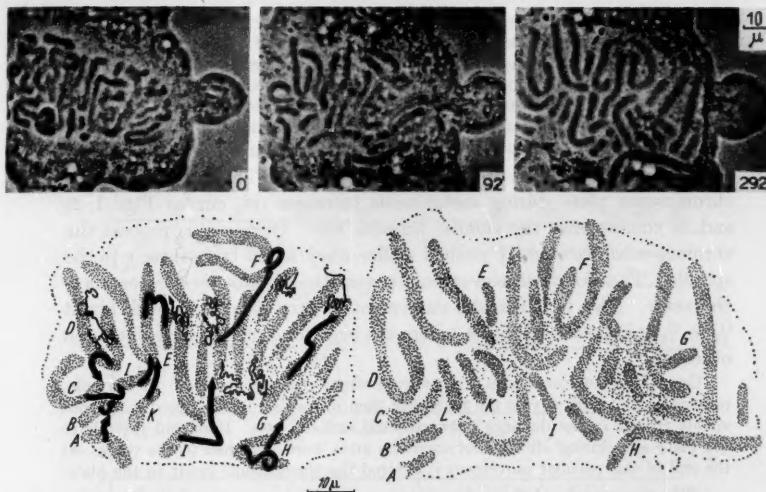


Fig. 9. The paths of kinetochores in metakinesis in an extremely flattened cell of *Haemanthus*—thick lines, and Brownian movements of small particles—thin lines. As the cell is very thin the lines are not projections, but actual paths. Cell No 1064. Cine film 16 mm

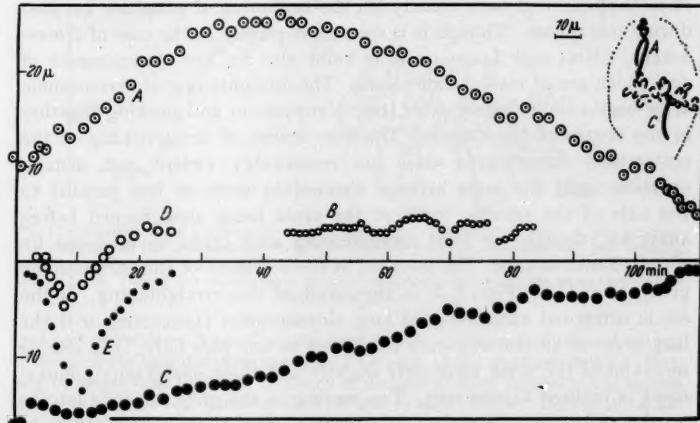


Fig. 10. Movement of the chromosome to the pole and its return to the plate in metakinesis of *Civia*. The position from the arbitrarily chosen line in the middle of the spindle plotted against the time. Micrographs of this cell are given in Fig. 4. Simultaneously with the movement to the pole the chromosome at the opposite pole moves to the plate. 0 time for A and C—1 hr 50 after beginning of C.S., for B longer. For D and E 0 time just after the C.S.—D—kinetochore, E—arm of the same chromosome. A, B and C—kinetochores. An example of an extraordinarily long metakinesis. The movement of kinetochores is jerky and the behaviour different: while some move over the longer distances, others oscillate only slightly

anaphase does not begin and the chromosome plate, perfectly regular at first, becomes more and more deformed, the chromosomes are slightly pulled to one or the other pole and anaphase begins directly from the irregular plate. This resembles the efforts of anaphase which occurs in chick tissue culture (HUGHES and SWANN 1948). The change of the plate during its long duration is seen in Fig. 12. In general it is not possible in any case to predict the duration of the stage i.e. metaphase, in which the plate does not change or changes only slightly.

Movement of kinetochores across the spindle. The breadth of the chromosome plate during metakinesis increases (cf. curves Figs. 1, 2) and in consequence the spindle breadth also. During this process the chromosomes are slightly pushed aside—they move transversely to the spindle. This kind of movement across the spindle is of secondary character. Also in *Clivia* the movement of chromosome through about $\frac{1}{3}$ to $\frac{1}{4}$ spindle breadth, just before the beginning of anaphase, has been observed.

One of the chromosomes first moved slightly (a few microns) to the pole, returned about half way to the plate and then moved across the spindle, without visible change in the distance between itself and the pole. It moved just above the plate and during all the movement its arms were stretched to the poles. At the end of this peculiar movement it entered the chromosome group in the plate.

The movements of the chromosome arms. The waving of the chromosome arms with a strong tendency to arrange themselves *parallelly* to the long axis of the spindle is one of the most characteristic features of metakinesis and lasts usually till the beginning of anaphase i.e. also during metaphase. Though it is seen most plainly in the case of *Haemanthus*, *Clivia* and *Leucojum* it is valid also for the chromosomes of *Iris* which are of medial dimensions. The straightening of chromosome arms begins immediately after their compression and pushing together in the centre of the spindle. The first stages of straightening of the compressed chromosome arms are remarkably violent and usually continue until the arms arrange themselves more or less parallel to the axis of the spindle, most of the arms being straightened before anaphase, though the final straightening may often be preceded by repeated movements. The increase in the diameter of the chromosome group after C.S. (Figs. 1, 2) is the result of this straightening. If the set is composed exclusively of long chromosomes (*Leucojum*) or if the long arms of all chromosomes straighten to one pole only, then during metakinesis the arms wave only slightly and their straightening movement is realised in one step. The waving of the arms depends largely on the space and often does not occur in flattened cells. If there is enough space the movement of long arms in metakinesis is in many cases very strange and unexpected. The analysis of the behaviour of the chromosome ends is given in Figs. 6, 7, 8.

In this flattened cell the paths of the ends of the longest chromosomes are not the projection of but the actual course. The different behaviour of the two chro-

mosome ends in C. S. has already been described (p. 564). The characteristic poleward movement of the chromosome ends after C. S. is discernible at first glance. The paths of the chromosome ends (Fig. 7) and the curves for them (Fig. 6) agree remarkably. The paths of the E chromosome end in Figs. 6 and 7 are almost exactly the same, and for F a small divergence appears only at the time 85–90 (double peak in Fig. 7 and one peak in Fig. 6). Similarly the divergences in the

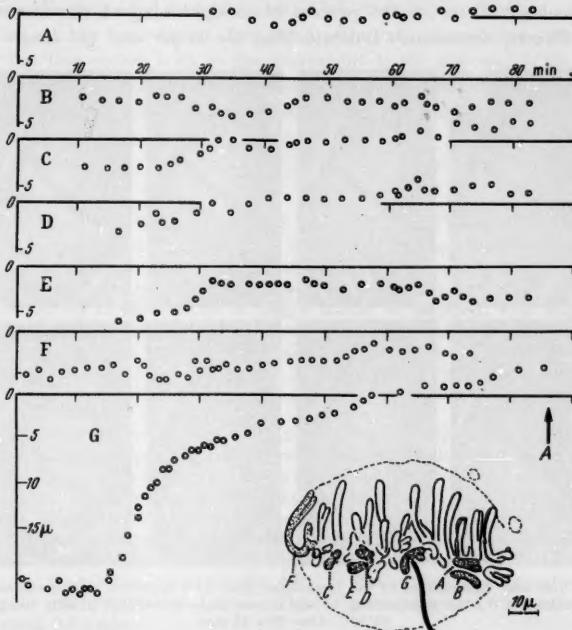


Fig. 11. Oscillations of kinetochores during metaphase plate stabilisation in *Haemanthus*. The distance of the kinetochores from the arbitrarily chosen abscissa (the line crossing most kinetochores) plotted against the time. The position of abscissa is the same for all kinetochores. One of the kinetochores returns from the poles and in the same time others oscillate slightly

final part of the curve B and C are not considerable. In the movement and waving of the arms the long distances covered by the ends of the arms are striking: they may be longer than $10\text{ }\mu$. The tendency of the arm to move parallel to the spindle axis is very plain—cf. paths of the F, C and D ends (Fig. 6). During the short and violent movements the kinetochores are practically motionless—e.g. curves CK in time 70–90 and FK in time 80–90. Fig. 8 also illustrates the violence of the movement.

During the movements the arms do not turn around their axis and coils do not become visible. The short duration of the movements seems to exclude any structural changes inside the chromosomes. The

arms in this cell are without doubt inside the spindle and not in the cytoplasm, though in other cells the arms stretched into the cytoplasm may be displaced by movements of the cytoplasm. The movement of such an arm (*Clivia*, Fig. 6—left corner) in cytoplasm would be slower, if the resultant movement caused by the kinetochore were subtracted.

The observations on the process of straightening of chromosomes with different dimensions indicate that *the larger and the longer the*

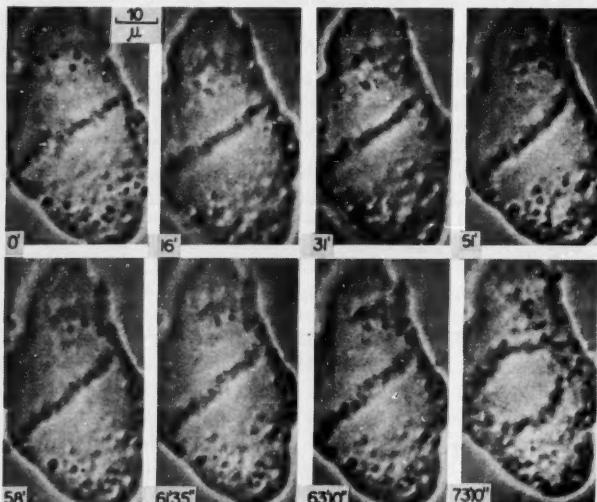


Fig. 12. The long stabilisation of the metaphase plate in a flattened cell of *Colchicum*. Late metakinesis 0', the deformation of metaphase plate 31'—61'35", early anaphase 63'10". Cine film 16 mm.

chromosomes are, the stronger is their tendency to arrange themselves parallelly to the spindle axis.

This seems to be caused by the correlation of the following factors: chromosome stiffness, different distance from the plate of the area in the spindle in which the force begins to act and the correlation between the force acting on the kinetochores and chromosome ends. This problem is far from being fully understood and will not be discussed in detail in this paper.

In the cell of *Haemanthus* described above it also appeared to be possible to find out the relation *between the moment of the bending of the arm and its distance from the pole or the plate*. These observations may throw some light on the *mechanism of the arm movements*. In this case one end of one chromosome was placed about 8μ nearer to the pole than that of another one, i.e. both lying on a line parallel to

the spindle axis. Finally these two arms bent to the plate, but not simultaneously; the arm placed farther from the pole began to bend later. Its start occurred approximately after an interval corresponding to that which the arm nearer to the pole would have needed to traverse the 8μ with constant velocity. This indicates that during this bending the *impulse proceeded from the pole*. Unfortunately no further cells for detailed studies were found, but some observations on other cells indicate that this occurs both in the movement *to the pole and to the plate*.

The following conclusion concerning the movements of the arms placed inside the spindle is suggested: *the movement of the chromosome arms is passive and is caused by the forces acting in the spindle and not in the chromosomes.*

d) Velocities in the spindle during C. S., metakinesis and metaphase

Measurements were taken mainly in *Clivia* and *Haemanthus* where the movements are of the same order, although the values for *Haemanthus* are somewhat higher. They may, however, be compared with each other.

The velocity of kinetochores in C. S. is similar to the speed with which the whole chromosome group is compressed and it may exceed $1.5\mu/\text{min}$. This velocity if compared with the velocities in metakinesis rather resembles the velocity of the arm ends, not that of kinetochores. In comparison with the other movement in the spindle it is of the order of the anaphase movement, the quickest movement of the chromosomes.

In metakinetin movement of the kinetochores, the velocities during the considerable changes of position are generally higher than during the oscillations. Also there seems to be a difference in the movement to the pole and away from it. The duration of the migration to the pole is usually much shorter than that to the plate. In *Clivia* the velocity to the pole in travelling over longer distances may reach about $1\mu/\text{min}$., and the return of the same chromosome $0.3\mu/\text{min}$. (Fig. 10). In travelling over shorter distances the velocities may be somewhat higher, but the relation is retained (Fig. 6D). In *Haemanthus* the maximal velocity during the return was about $1\mu/\text{min}$. (Fig. 11G), but in several other cells it did not exceed $0.5\mu/\text{min}$.

Thus, the velocity of the kinetochore movement to the pole is usually 2—3 times greater than during the return.

The maximal velocity of the kinetochores during the oscillations in the plate is slightly above $0.5\mu/\text{min}$. (*Haemanthus* Figs. 6 and 10), but usually does not exceed $0.3\mu/\text{min}$., i.e. it is of the order of velocity of the kinetochores returning to the plate. The order of this last movement resembles the velocity of the mean movement of particles undergoing Brownian movements (cf. p. 594).

The highest velocities observed inside the spindle at any time of mitosis, not considering Brownian movements, are the maximal velocities of the chromosome ends. In *Haemanthus* (Fig. 6) these range from $2.5\mu/\text{min}$. to $3\mu/\text{min}$., which is more than twice that of the maximal velocity of anaphase chromosomes in the same cell, namely $1.3\mu/\text{min}$. The mean velocity of chromosome ends was 0.4 to $0.6\mu/\text{min}$. The maximal velocity is 2—3 times higher than that of the kinetochores moving to the poles and the means are of the same order. In the movement of the ends of chromosome arms no differences in the velocity dependent on the direction i.e. from or to the pole was observed, but it is not impossible that such

a correlation exists and would be discernible in more numerous measurements. As the kinetochores may be practically motionless during the movement of the arms these ought to move along an arc. If they make a straight line this means that secondary bendings in different parts have occurred.

Taking into consideration the facts enumerated above it is obvious that *the ends of the chromosome arms may move with higher speed than the kinetochores*, which would suggest that the mechanism of these two movements is different.

e) *Anaphase*

Only examples of atypical anaphase will be considered here. The study of the normal course of anaphase was the main object of some of the earlier papers (BAJER 1953a, b, BAJER and MOLÈ-BAJER 1954).

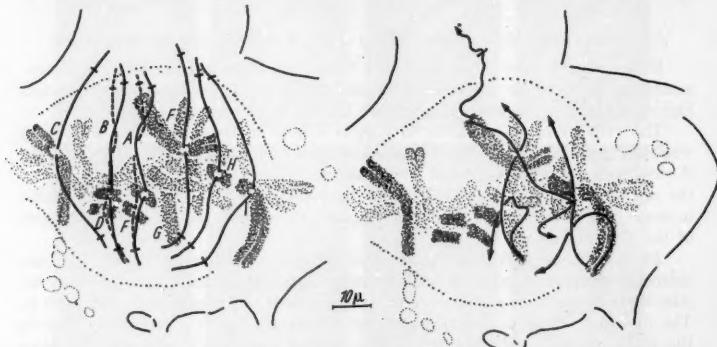


Fig. 13. The paths of the kinetochores and the paths of the ends of chromosome arms during anaphase. The paths of the chromosomes which move one after the other (cf. Fig. 18) is dotted. In metaphase one of the chromosomes is off the plate. The curves of the anaphase movement of some of the chromosomes are given in Fig. 15 and micrographs in Fig. 14. *Haemanthus*—cell No 1062. Marking of the chromosomes the same as in Fig. 15

In these papers pushing body action in normal mitosis in endosperm was proved. It was found that the pushing body acts from the beginning of anaphase (*Iris*), or begins to act in mid anaphase (e.g. *Haemanthus*, *Ornithogalum* and others). In extreme cases the action of half spindles and pushing body may be slightly separated in time, and then the characteristic bend in the curves of anaphase movement is found. This indicates that as far as the pushing body is concerned there is no great difference between the anaphase of plants and animals and that the two types of anaphase described by Ris (1943) are common to plants and animals.

Some examples of an atypical course of anaphase, described below, are the result of special mechanical conditions, though also secondary mechanisms may be involved. Such deviations are *very rare* and are found in a small percentage of cells, usually in flattened ones. Even in most extremely flattened cells the course of anaphase is perfectly

normal. The deviations are more often found in plants with large chromosomes, and have been observed only a few times in plants with small ones. In the deviating cases of anaphase the orientation of the kinetochores plays an important role. Small chromosomes may turn much more easily than large ones, which explains the rare occurrence of abnormal anaphase in plants with small chromosomes.

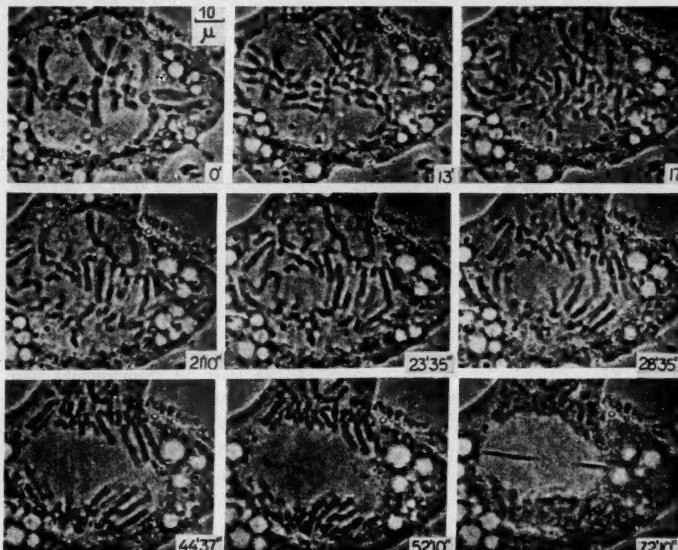


Fig. 14. Anaphase in *Haemanthus*. Time given in micrographs. Metaphase with one chromosome off the plate and during anaphase two pairs of chromosomes move one after the other. Analysis of this cell is given in Figs. 13, 15 and 18. Cine film 16 mm

Anaphase without metaphase plate stabilisation. In very flattened, and, in consequence, very thin cells there is not enough space to arrange all the kinetochores in one plane, or often even the row perpendicular to the spindle length. As the chromosomes are placed more or less in one layer, the kinetochores are placed in rows one above the other (e.g. cf. Fig. 10, BAJER 1954a). All transitions from cases without plate formation resembling metakinesis, to perfectly normal ones in which all kinetochores are arranged in one row and which may be found in very broad spindles, were observed. Fig. 4 illustrates the metaphase in which only one chromosome is not in the plate. Though a regular plate is not necessary for equal chromosome distribution, its formation facilitates the division and, when not achieved, the duration of metaphase or rather metakinesis is very long. After an unstabilised plate, the course of anaphase is usually asynchronous, and the moment when the single chromosomes begin to move to the pole is related to the position in the plate. In such anaphases often an unequal chromosome

distribution was observed, and more than one and sometimes up to even $1/4$ of all chromosomes may move to one pole.

Sometimes the kind of disturbances may be predicted from the shape of the metaphase plate. This is true of the Y-shaped metaphase plate (BAJER 1954a). In the case of large chromosomes a plate of this type is followed by tripolar anaphase, but in cells with small or in medium chromosomes (*Iris*), only unequal distributions have been found. One case of this type was observed in *Iris*.

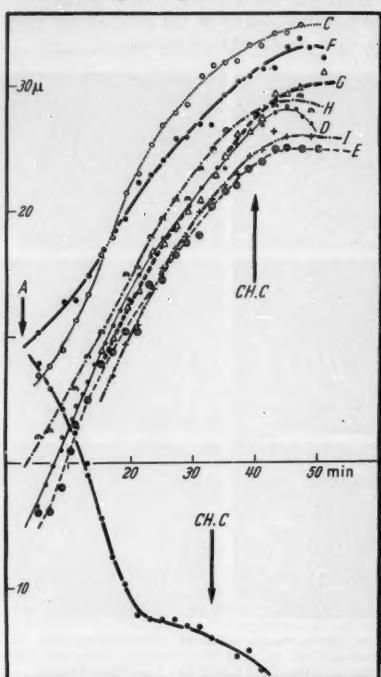


Fig. 15. The distance between kinetochores in anaphase of *Haemanthus* plotted against time. Arrow A—beginning of anaphase. CH.C—chromosome contraction during early telophase. Except for chromosome F the movement to one pole only is given

moving to one pole may not be the same, though for most of them they are (Fig. 15).

In the cell illustrated by Figs. 14—15 the length of the tracks of different kinetochores were not the same. Chromosomes C and I had slightly different velocities during anaphase. Chromosome F was at least 6μ out of the plate. Its movement began simultaneously with the others but was a little slower in late anaphase, and other chromosomes come close to it. Chromosomes D and E, situated very near each other, began to move at the same time but differed in the length of their paths. However, the velocities of most chromosomes situated

In this cell after a very long Y-metaphase (over 1 hr.) with visible efforts towards normal plate formation, anaphase began at first in two branches of the Y-shaped metaphase, and in middle anaphase the third branch joined one chromosome group moving to the pole. As a result at least 10 chromosomes were present in duplicate at one of the poles.

In perfectly normal anaphase the velocities of the two chromosome groups as a rule are slightly different (BAJER and MOLÈ-BAJER 1954). In asynchronous anaphase different chromosomes begin to move to the same pole non-simultaneously. It appeared also that in such an anaphase the velocities of different chromosomes

same, though for most of

at different positions of the plate usually have almost parallel curves. This anaphase was only to a slight degree asynchronous. In other anaphases these differences can be much greater.

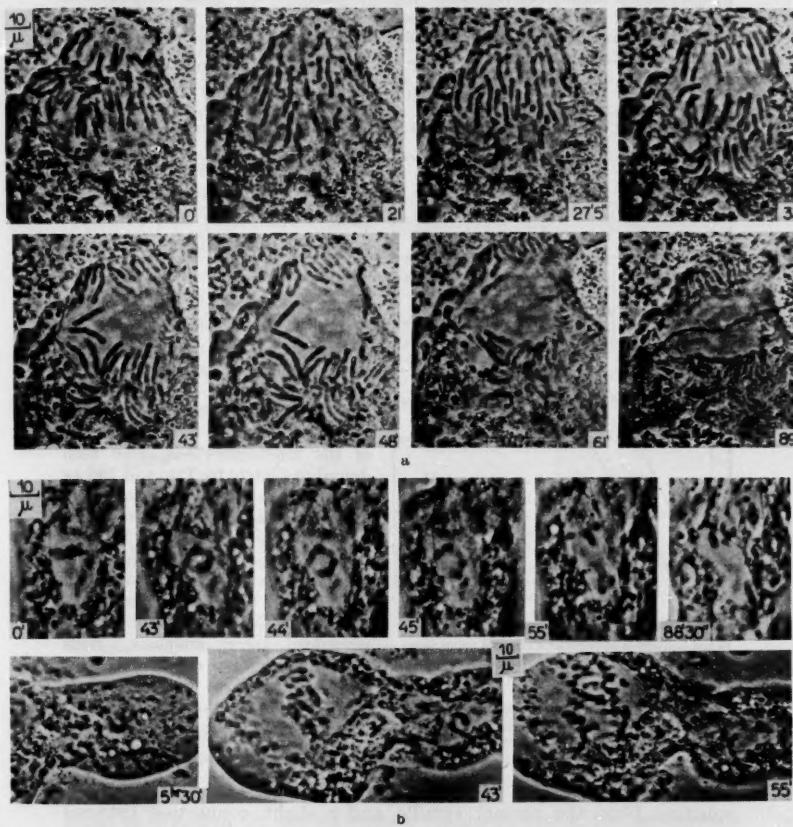


Fig. 16a and b. Upper half: Anaphase of *Leucojum*. Many chromosome arms moving in advance of the kinetochores; one chromosome lagging. Time given on micrographs. Cell No 262.—Lower half: Anaphase in a small spindle containing only 2 chromosomes of *Clivia*. In the first stages only one chromosome is seen, in later ones two. Below, stages of the spindle from which the small one originated. Full description in the text. Cell No 299. Both cells cine film 35 mm

Non-synchronous anaphase may also be found in very narrow and usually partly flattened spindles. This type was described in detail in thin cells in normal *Allium* root tips and by THERMAN (1951) also in *Allium*.

In such cells owing to lack of space, the chromosomes may move at different times: those placed nearest the pole start moving, others "wait for space" and begin their movement immediately they get room. In such cells the movement to the poles is usually asynchronous and the distribution is often unequal. The observation of the motion picture of such cells indicates that such a course of anaphase is caused only by the aberrant mechanical conditions.

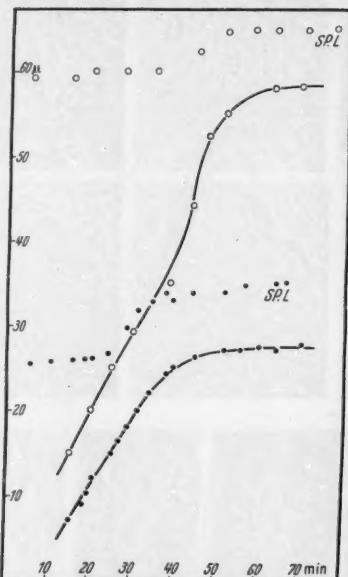


Fig. 17. Curves of the chromosome movement in the *Clivia* cell of Fig. 16. The distance between kinetochores (continuous lines) and the spindle poles (dots and circles, SP. L.) plotted against the time. Circles represent movement in the large spindle, dots that in the small one with two chromosomes

chromosomes only is represented. This small spindle originated by splitting from the normal spindle and a slight connection between these two spindles may be seen (Fig. 16).

It is very interesting that the anaphase movement in the small spindle began simultaneously with the anaphase in the mother spindle. The length of the path of the chromosomes in the small spindle was less than half as long. The curve for the chromosome separation of these two chromosomes (Fig. 17) in the small spindle appeared to be similar to that in the mother cell: first the length of the half spindle shortened and then the second mechanism, the action of the pushing body, began to act. This indicates that even two chromosomes are sufficient for normal anaphase. However this concerns the anaphase separation only and in this cell no

Non-synchronous anaphase occurs also when chromosomes lag. An example of such an anaphase is given in Fig. 16. This cell also represents a case of anaphase without exact metaphase plate stabilisation and of movement of part of the chromosomes with the arm ends in advance of the kinetochores.

The lagging chromosome is recognisable from 27'5" on and its movement seems to indicate that the kinetochore is at the end of the chromosome as only one arm seems to be present. Such a terminal position of the kinetochore has often been described—lately by TJO and LEVAN (1954); CLEVELAND (1953) described a beautiful case in *Holomastigotoides tusitala*. In the case of Fig. 16 there may be no kinetochore present at all and the movement may be explained by the action of the same forces which act on the particles with brownian movement during anaphase. Such a mechanism may explain the late movement of these lagging chromosomes toward the poles.

In the same Figs. 16—17 the anaphase in a spindle with two

phragmoplast with cell wall was formed. Also no telophase nuclei were seen, and in later stages the chromosomes were probably resorbed in the cytoplasm, while in the main spindle both cell wall and normal nuclei were formed.

Similar cases of splitting of the spindle were also observed in strongly flattened cells of *Haemanthus* during prophase. Also in the anaphase of *Haemanthus* one or two chromosomes may follow one another exactly (extremely flattened cells, Figs. 13, 14, 15, 17).

Though the paths of such chromosomes may be slightly different (Fig. 13), in motion picture projection one has a strong impression that they move exactly one after the

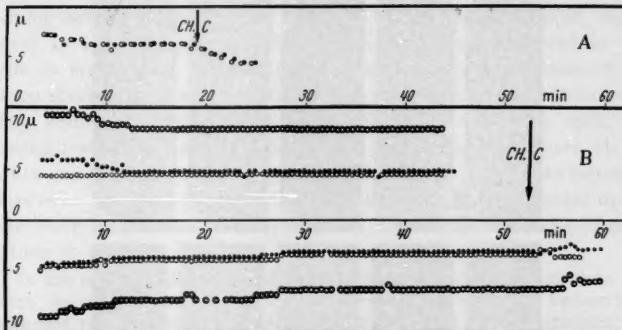


Fig. 18A and B. The distance of chromosomes within daughter groups during anaphase plotted against time (cf. Figs. 13, 14 and 19). CH.C—chromosome contraction in late anaphase. A The distance between two kinetochores (chromosomes marked by A and B in Fig. 13) moving to the same pole. *Haemanthus*—cell No 1062. B The distance between three kinetochores following each other (Fig. 19, arrow) within the two daughter groups. Large white circles (extreme rows) represent the distance between outermost and innermost kinetochores (of large and small chromosome). Black circles give the distance between middle and innermost kinetochores (at upper pole for two small chromosomes, at lower pole for small and large chromosome). Small white circles give the distance between the two outer kinetochores (of the chromosomes nearest to the poles and the following ones). *Haemanthus*—cell No 1063

other, especially in the second case they move in one line (Fig. 19). The distance between the kinetochores of these chromosomes diminishes slightly towards middle anaphase and then remains constant to late telophase, where it changes in consequence of chromosome contraction. In Fig. 18A the distance between these kinetochores first diminishes (arrow M). At this time the kinetochores have separated for a length of 15 μ , then the distance between the kinetochores of two chromosomes does not change throughout a further 25 μ of anaphase migration (until arrow CH.C.—contraction of chromosome length). During diminution of the distance in late anaphase the kinetochores separate only 5 μ (after the arrow CH.C.). In B, where the distance between three kinetochores is registered, the most interesting point is the distance between the extreme kinetochores (the first and the last). There are slight differences between the two groups of anaphase chromosomes. In the upper curve the distance between the kinetochores diminishes until 20 μ of anaphase separation have been covered (arrow M—middle anaphase) and then move for about 30 μ more without change in the distance between each other. The distance

between the three kinetochores diminishes in late anaphase during chromosome contraction (arrow CH.C.). During this stage anaphase groups separate only 5μ further. In the lower curve the distance between the three kinetochores diminishes till almost late anaphase (arrow L) i.e. till 35μ of anaphase separation, and the distance between the extreme kinetochores is unchanged only in about 15μ of anaphase separation.

During the projection one gets a strong impression that *the first* of these chromosomes *pulls the others*. If the tracks are not the same the

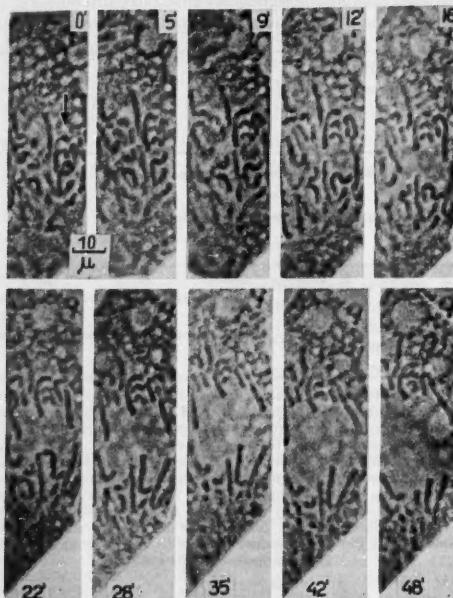


Fig. 19. Anaphase of *Haemanthus*. The movement of the three chromosomes (arrow) analysed in Fig. 18. Cell No 1065. Cine film 16 mm

second chromosome oscillates along short arcs, without detectable change in the distance from the first (Fig. 14). Also at some moments there seems to be a material connection (darker fibre) between two kinetochores. As the cells are very thin and the chromosomes are moving exactly in one plane it seems probable that all these chromosomes are engaged in the same mechanism of movement. The shortening of the distance between the extreme kinetochores seems to be connected with the fusion of the traction mechanism of these two or three chromosomes into one. If the above suggestions are correct such fusion may be achieved at different times which would explain why the

shortening of the distance between the extreme kinetochores during anaphase occurs at different times. The changes in the distance after the chromosome contraction are easily understood and are caused by the formation of telophase nuclei.

f) Endomitosis

The occurrence of endomitosis in endosperm has been reported by many authors (BRINK and COOPER 1947, PUNNET 1953 et alii). Giant nuclei even 20 or more times larger than the normal ones and containing several nucleoli, were found in all the plants studied, though never in large quantities. The chromosome cycle observed in such cells *in vivo* was as follows: the long and thin chromosomes of prophase shorten more and more and their refraction coefficient increases, they acquire the appearance of metaphase chromosomes, split, and resting nuclei are formed. The nuclear membrane disappears, though in not one case was a tendency to spindle or metaphase plate formation observed. The process of endomitosis lasts for several hours, in any case much longer than normal mitosis. A particular example of endomitosis is given in Fig. 20.

In this extremely flattened cell the cytoplasmic structure seemed to be completely destroyed as Brownian movements were very vigorous. The nuclear membrane was very distinct and the nucleus large and with distinct structure. The nucleolus of this cell and of others in normal prophase is composed of two substances (EHRENBORG 1946, BAJER 1953c, LETTRE and SIERS 1954): half liquid substance, which is the main component and small granules (in fixed material double refractive—BAJER 1953c), differently distributed and of varying number. The refraction coefficient of the small granules is slightly higher and when the nucleolus disappears in prophase the process of their fading is a little slower. In this cell the nucleolus did not disappear but changed its shape and then suddenly partly flowed out of the cell (Fig. 20). However the parts of the nucleolus did not disappear completely. The changes in the chromosome cycle are distinct (0' to 43'50') without any trace of spindle formation i.e. no such characteristic first sign of spindle formation, as the broad clear space around the prophase nucleus became visible. After the splitting of the chromosomes they are not united at the kinetochores and separation is complete. After some hours in this cell a perfectly normal resting nucleus was observed.

The question arises as to whether the above described case was a normal endomitosis i.e. would endomitosis have occurred in it, if the cell was extremely flattened? Although it is not possible to solve this question definitely it seems probable that this endomitosis is experimentally induced by the particular mechanical conditions which prevented the formation of the normal mitotic spindle (extreme flattening and destruction of cytoplasmic structure).

This is connected with the question as to whether the spindle arises from the cytoplasm or from the nucleus. JUNGERS (1931) is of the opinion that the "clear space" around the nucleus i.e. the first stage of the spindle formation is not of

cytoplasmic but of nuclear origin. BECKER (1935, 1938) also suggests that in the staminal hairs of *Tradescantia* the spindle is exclusively of nuclear origin because it is stainable by nuclear vital dyes. In the endosperm, however, the spindle at least in some parts arises from the cytoplasm; in cells with large quantities of starch grains and often in flattened cells where the cytoplasm does not surround the nucleus from all sides the spindle is not well developed. In these two cases

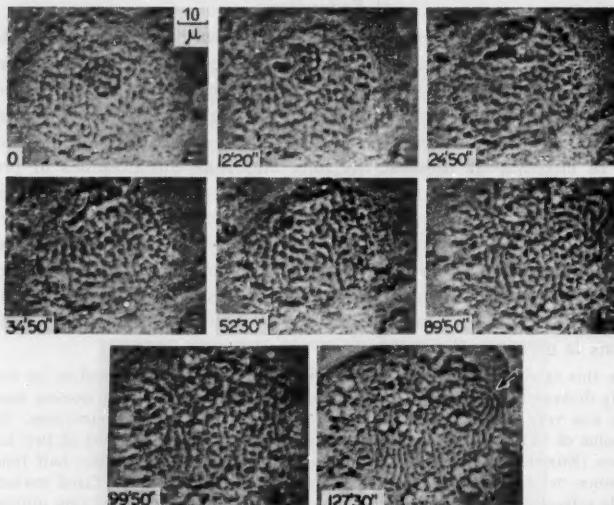


Fig. 20. Endomitosis in extremely flattened cell of *Leucojum*. In this cell the cytoplasm is very fluid and its structure seems to be destroyed. Time given on micrographs. The structure of the nucleolus is visible. Nucleolus flows out from the nucleus at 24' 50"—43' 50", but part of it remains in the nucleus. Nuclear membrane disappears late (45'). The beginning of the separation of the chromosomes begins in 99' 50"—arrow indicates probable position of kinetochore. Cell No 279. Cine film 16 mm

the conditions for the partial formation of the spindle from cytoplasm are not suitable and the volume of the spindle is smaller, which suggests its partially cytoplasmic origin in other cases.

2. Cytoplasmic movements

In these studies the observations on the behaviour of the cytoplasm concern the period from prophase to telophase.

The lack of cellulose walls makes possible the formation of cytoplasmic protuberances. These pseudopodia-like strings of cytoplasm may form during the whole division, but are most conspicuous in prophase and telophase. During pro- and metaphase the shape of the cell often changes to a sphere or an ellipsoid—often without pseudopodia formation. It is of interest that in other material the cells often become round before metaphase. In animal tissue it is well known that the pseudopodia disappear before anaphase (HUGHES and SWANN 1948, HUGHES 1952,

Boss 1954b and others). Endosperm cells often form outpushings again during the telophase. In telophase the prolongations of outpushings often intersect in the centre of the nucleus. Micrographs of such cells have been given previously (BAJER 1953b). Inside the outpushings the cytoplasm is not motionless but usually shows typical movements which resemble either pulsations or a kind of *periodical longitudinal movement*. This consists in the transportation of ball-shaped enlargements along the string of cytoplasm. Such an enlargement moves uniformly in one direction immediately, or after some oscillations. Such movements and transportsations of even a few particles or only a single tiny one (diameter sometimes less than $1\ \mu$), is observed also in extremely thin cytoplasm strings at the limit of visibility. The movements in the strings are often so quick that they are directly visible under the microscope without acceleration i.e. they are of the order $10\ \mu/\text{min.}$ or faster. The course of movements seems to be similar to that observed by KAMIYA (1953 — in this paper KAMIYA gives references to his earlier papers) in slime molds, though much slower. Growth and disappearance of pseudopodia are often observed. The movements described above, though often visible in dividing cells and more exaggerated in prophase and telophase, therefore correlated with general cytoplasmic changes during mitosis, are also observed in many, often in all resting cells (in young endosperm).

Cytoplasmic movements around the nucleus and the spindle were examined in detail. During pro- and metaphase and *till middle anaphase* no directed movements were observed. There exists, however, a slight movement, "the boiling of cytoplasm". In anaphase of many cells the cytoplasm above the spindle poles (indicated by thin arrows Fig. 21B) is compressed by the moving apart of half spindles as a result of pushing body action. Soon afterwards very distinct cytoplasmic movements set in at middle and late anaphase in not-flattened cells, and often in the flattened ones also. The most vigorous movements were observed in *Clivia* and *Iris*, though, to a different degree in all other species studied as well. The directions of the cytoplasmic current are generally constant in all cells, but they are partly governed by the mechanical conditions in the cell. The directions are illustrated in Fig. 21.

The drawings in Fig. 21 (A—F) are only cross sections through the actual movement, i.e. the movement takes place around the spindle. To a much smaller degree this is the case in G—H (Fig. 21) as the cell is partly flattened, and it does not occur at all in I and H (Fig. 21) because these cells are extremely flattened.

There are *two directions of cytoplasm movements: parallel and perpendicular to the spindle axis*, the movement in the first direction begins earlier and the accumulating of a mass of cytoplasm around the middle of the pushing body is distinctly visible. During this movement the vacuoles are often caught by the current and are pushed to the middle of the cell. The vacuoles change their shape during the movement, they may fuse into larger ones, disappear, or new ones reappear (Fig. 22), i.e. thus they greatly resemble *contractile vacuoles*. The direction of the movement *from the pole* depends largely on the mechanical conditions in the cell. In vacuolated cells these movements may not be gliding ones along the spindle as they usually are, but may take place between

the vacuoles and the cell walls (Fig. 21 G). In some cells the current of the cytoplasm may be partly or exclusively the cause of the bending of the interzonal region in late anaphase. The movements perpendicular to the direction of the separating chromosomes which appear in the later stages press on the middle of the pushing body. *The mechanism*

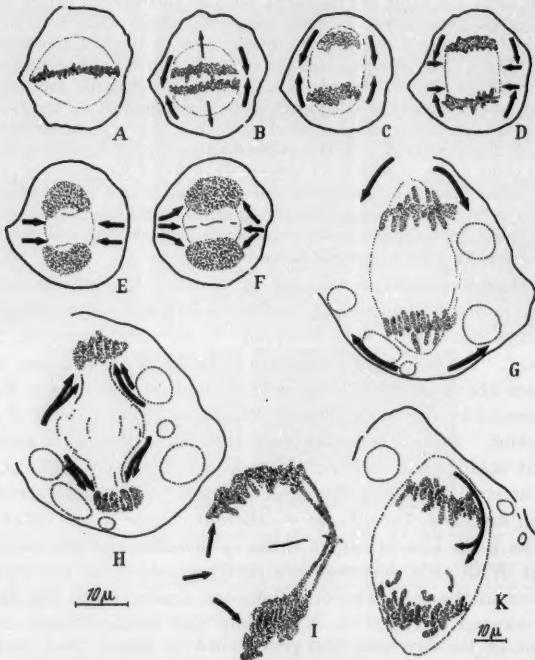


Fig. 21 A—K. Cytoplasmic movements in anaphase. Drawings from cine film. The middle of the current indicated by thick arrows. A—F, *Iris*, G—H and K *Clivia*, I—*Haemanthus*. Full description in the text. *Iris*—cell No 179. *Clivia* H—G No 304 (micrographs of this cell are given in Fig. 23), K No 326 b. *Haemanthus*—cell No 1061

of the first stages of the current perpendicular to the long spindle axis seems to be as follows: two currents of the cytoplasm from the opposite poles meet in the middle region of the cell and the excess of the cytoplasm flowing from the poles compresses the interzonal region. This movement begins some minutes after the meeting of these two currents. Then the flow from the poles ceases and only the perpendicular one towards the spindle axis is continued. Usually the phragmoplast begins to be formed simultaneously. A few minutes afterwards the currents

begin to change their directions, and they turn more or less *toward the poles*, gliding along the phragmoplast. The direction of this movement is not exactly the same in different cells. The movement has a tendency to cut off the young nuclei from the phragmoplast or to push them further apart. In the latter case (Fig. 21H) the current glides exactly on the phragmoplast. As a result of this movement the cytoplasm accumulated on the border of the nucleus and the phragmoplast forms a narrowing ring and the diameter of the phragmoplast just on the border of the nuclei quickly diminishes. This is seen in the series of micrographs (Fig. 23). The most vigorous movement in the direction

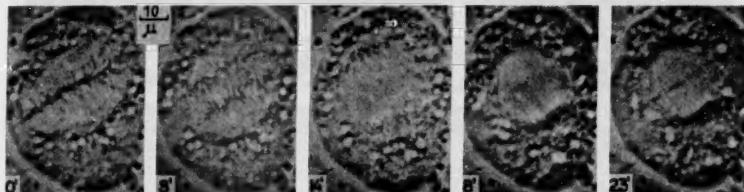


Fig. 22. The movement of vacuoles in *Iris* caused by cytoplasm currents. Time given on micrographs. The vacuoles move along the sides of the spindle in the direction of cell plate. The direction of the movement the same as in Fig. 21B—C. Cine film 16 mm

to the poles is observed simultaneously with the shortening of the chromosomes during telophase and the formation of the nuclei. The direction of this movement is also partly governed by the mechanical conditions—vacuoles etc.—and it may act from one side of the nucleus only. A case like this is shown in Fig. 21I: in this flattened cell the chromosome bridge from one side permits movement from the opposite side only. The first stages of movement—*movement from the poles along the spindle—vary in different cells* and are slighter in flattened cells. The last phase—*movement more or less to the pole—is found in all cells* even in extremely flattened ones. It is also visible during cell wall formation and ceases after partial formation of telophase nuclei.

A case which demands special attention as it may throw some light on the mechanism of the cytoplasm currents was observed in the cell drawn in Fig. 21K.

In this flattened cell the cytoplasm was extraordinarily stiff and almost no movements were observed in it. The cytoplasm formed a stiff layer around the spindle. During the movement of the chromosomes to the poles in late anaphase, a vigorous current of small particles was seen in one place only—on the side of the spindle between one group of anaphase chromosomes and the cytoplasm. The group of anaphase chromosomes gave the *impression of the movement of a piston* (chromosome groups) *in a loose cylinder* (surrounding cytoplasm) and pressing out some of the contents at the sides of the piston as a violent current.

At telophase in the phragmoplast of some cells the periodic movements of small bulbs closely resemble those of the thickenings in the cytoplasmic pseudopodia described above. Especially frequently were they observed in flattened cells of *Iris* and *Haemanthus*. It seemed as if the phragmoplast were composed of *many separate longitudinal strings* and in each of them the periodic movements were independent

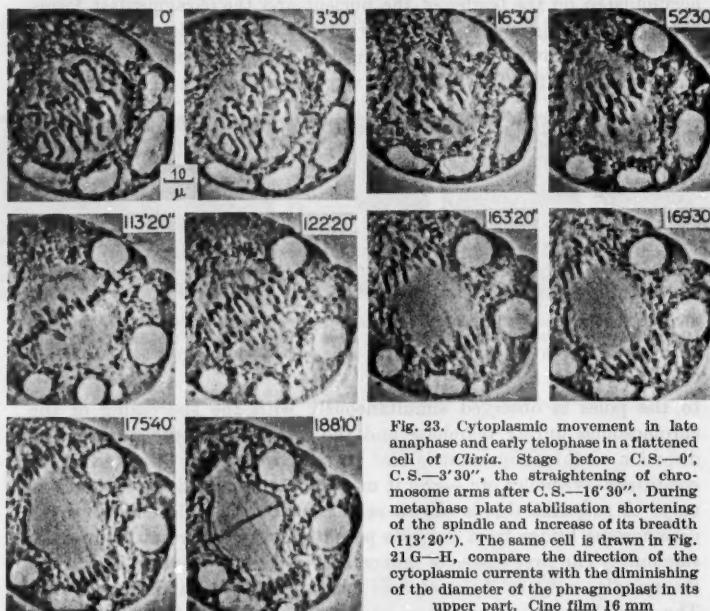


Fig. 23. Cytoplasmic movement in late anaphase and early telophase in a flattened cell of *Clivia*. Stage before C.S.—0', C.S.—3'30", the straightening of chromosome arms after C.S.—16'30". During metaphase plate stabilisation shortening of the spindle and increase of its breadth (113'20"). The same cell is drawn in FIG. 21 G—H, compare the direction of the cytoplasmic currents with the diminishing of the diameter of the phragmoplast in its upper part. Cine film 16 mm

of each other i.e. in each of them the periodic movement is in a different phase, though the velocity of the movement seems to be of the same order in the whole phragmoplast. It can be seen how one bulb follows another and such periodic movement lasts some minutes. This movement is directed to the poles and its intensity ceases at the chromosome group. To make this process visible, special mechanical conditions seem to be necessary, i.e. strong flattening which may even lead to longitudinal splitting of the phragmoplast in some parts.

It was not possible to measure exactly the velocity of the movement of the cytoplasm currents. Approximately it is of the order of the chromosome movement in anaphase i.e. 1—2 μ /min. In comparison with the currents found in other plant cells (*Elodea*—10 μ /min., *Niella*—54—56 μ /min., cited from HEILBRUNN 1952, p. 361) the currents during mitosis are extremely slow.

Observations on all kinds of cytoplasm movements are in remarkable agreement and though there are modifications of the movement in different cells the general course of the movement is the same in all plants and the causes of all the deviations from the general scheme are obvious and easily understood in each case.

3. The Brownian movements

Leucojum appeared to be the best material for the observations of Brownian movements, as the amount of small particles, plastids, or starch grains is considerable. However, *Clivia* and *Haemanthus* are also good materials and such observations are possible in *Iris*, though in this plant the particles are extremely small. In all plants during the projection only a small number of particles may be observed over a long time as most of them leave the plane of observations. Also in the film in some cases it is difficult to find out whether the particle is inside the spindle or outside it. However, the position and the ways of movement of numerous particles can be examined exactly. The easiest stage for analysing Brownian movements is the anaphase, because the particles are usually found in abundance and the position of many of them is certain.

The drawings of the paths and the curves (24—29 and 31—34) represent projections, because the particles oscillate in all directions, also parallelly to the optical axis. In the drawings the paths and oscillations are doubtless not exact to the finest detail and actually the amplitudes of oscillations caused by quick changes in the position of the particle are often larger. Also small changes in the position of the cell cause some errors in measurement, though cells with a visible change of position were excluded (except Fig. 33). These, however, influence only the finest details of the drawings and curves.

Studies on the Brownian movements have been carried out by many authors and the results obtained on different material are in general agreement, though not in all details. All authors found *freer movement parallel to the long axis of the spindle than perpendicularly to it*. On the other hand observations made during this work were quite unexpected in view of the previous results.

In prophase *before spindle formation* in exceptional cases small particles are found in the nucleus, and in the clear space around it. A few observed inside the nucleus and the "clear space" execute irregular movements in all directions. These movements closely resemble the movements of small nucleoli (cf. p. 560—561). It was not possible to compare the intensity of movement of these particles in this stage as only a few particles were studied.

During C.S. there were no particles whose movements could be observed over longer periods. Most observations concern the *time between metakinesis and telophase*. In direct observations of the living cells it is difficult to discover whether the particles move in one direction or have only a tendency to oscillate in this direction. The observations during moving picture projection indicate not only *the most common*

direction of oscillations but also the direction of this movement. Figs. 24—27 and 29—33 illustrate the paths of the movement.



Figs. 24—27. Brownian movements. Paths of particles with marked direction. 26—27—movements in metakinesis and metaphase, 24—25—in metaphase and anaphase; the arrow on the path denotes the beginning of anaphase. In Fig. 24 the particle moves in half spindle before chromosome group. The curves for E—F (26) and A (27) are given in Fig. 28, for C in Fig. 34. Further explanation in the text. 24 *Leucojum*—cell No 266. 25 *Haemanthus*—cell No 1070. 26 *Clivia*—cell No 300. 27 *Leucojum*—cell No 267.

Till metaphase most of the particles, usually with simultaneous oscillations, move to the spindle pole and vanish in the cytoplasm surrounding the spindle. Fig. 26E traces the path of such a particle, and Fig. 28 shows the curve of this movement. Other particles move

to the plate (Figs. 26 F and 28 F) or may only oscillate inside the spindle. Of 134 particles observed inside the spindle 74 moved to the poles, 22 to the plate and 38 oscillated inside the spindle. During oscillations in the spindle the resultant direction of some particles may be across the spindle (Fig. 25 A). In the movement of the particles 3 phases may often be distinguished:

1. *The particles oscillate irregularly with no tendency to move in any direction.* The duration of such movement is long, it often lasts for several minutes. When the particle oscillates at the pole usually no privileged direction of movement

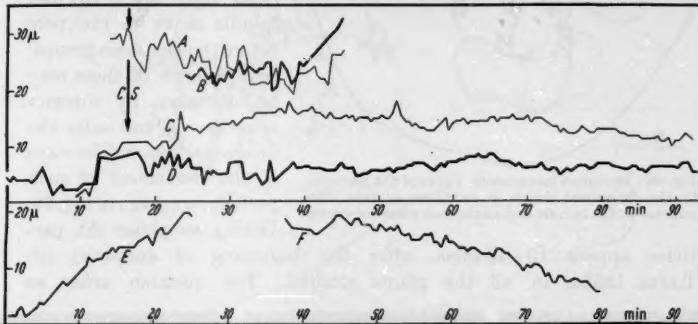


Fig. 28. Brownian movements. The distance of particles from the middle of the spindle—abscissa chosen arbitrarily—plotted against the time. Curves for metakinesis and metaphase. C.S. marked by an arrow—valid for the upper graph only. Note the violent and sudden movement of A and B in comparison to C and D after 40 mins. C and D in a cell with long metaphase plate stabilisation. E—F—the movement of the particle to the spindle pole and the movement of the other one in opposite direction—the differences in velocities remarkable. The paths of A and E—F are given in Figs. 27 and 26 respectively. A—B and C—D *Leucojum*—cells Nos 267 and 270 respectively. E—F *Citivia*—cell No 300

is noticed while in the middle of the spindle there is a tendency for oscillations parallel to the spindle axis.

2. In a relatively short time—10—30 min.—*the particle moves to the plate or to the pole.* The oscillations during this migration are slight in comparison with those in the first phase. The movement is interrupted by stationary moments and often by slight movements in the opposite direction. The particle very often moves in jumps, it is motionless for some minutes or executes only slight oscillations and then suddenly moves quickly a few microns to stop again, this being repeated many times. Jumps are also visible in other stages, and distinctly in Fig. 33C—stationary moments indicated by asterisks.

3. In the last phase *the first one is repeated.*

Not all particles show these phases distinctly, in general they are the rule for all movements over longer distances. The intensity of the oscillations of the particles which do not move in any direction is variable. Some of them oscillate slightly for a long time while the amplitude of others is considerable. The amplitude of oscillations of

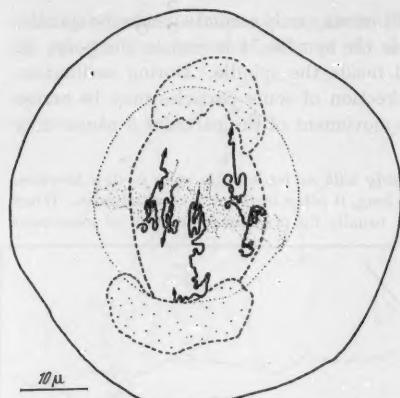


Fig. 29. Brownian movements. Paths of the particles in the interzonal region in anaphase of *Iris*. The outlines of the spindle and metaphase plate are drawn

particles appear 10—15 mins. after the beginning of anaphase (cf. BAJER 1953a) in all the plants studied. The question arises as

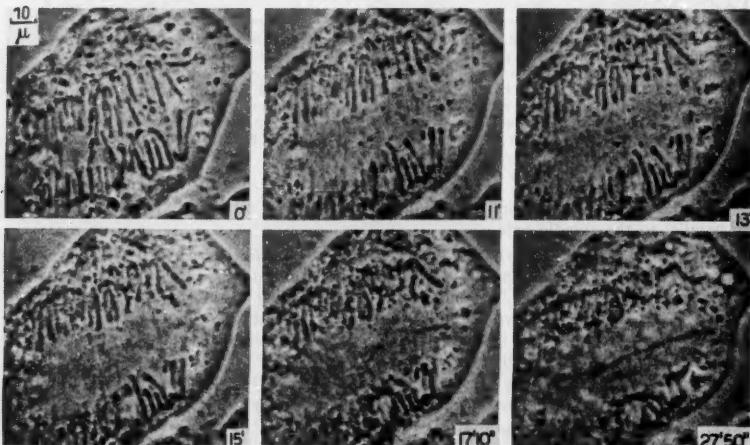


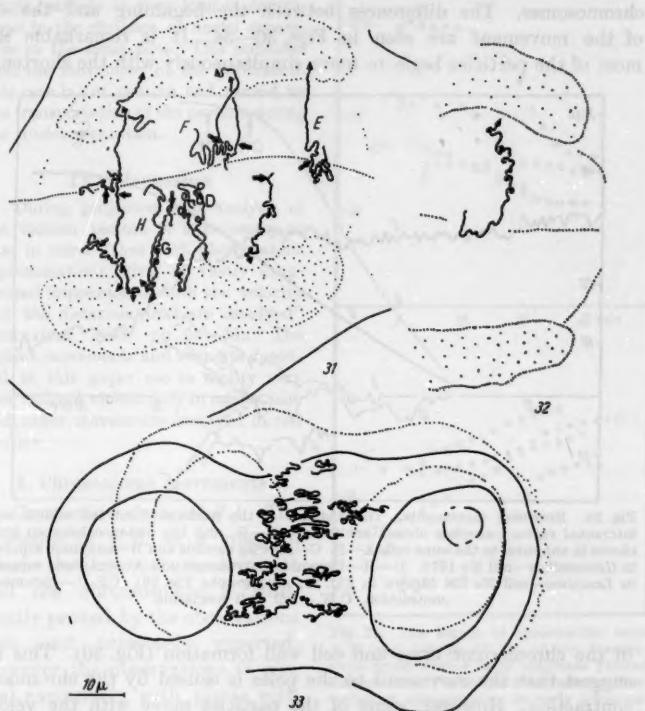
Fig. 30. Brownian movements. *Leucojum*, cell drawn in Fig. 31. Time given in micrographs. It is well discernible that the particles move to the pole in late anaphase and successive stages of some of the particles can be traced. Cell No 254. Cine film 16 mm

to how they get into the interzonal region in middle anaphase. The cytoplasm currents from the poles (cf. p. 585) offers the most probable

the same particle may also change and it is not known whether it is related to the stage of mitosis, though some observations suggest such a relation (Fig. 28A, B, C and D).

In anaphase the particles which are in the half spindle move to the pole before the anaphase groups, though some of them may be overtaken by chromosome groups and enter the interzonal region. The ways of the movement of such particles are given in Fig. 24. During anaphase the particles appear 10—15 mins. after the beginning of anaphase (cf. BAJER 1953a) in all the plants studied. The question arises as

explanation. Fig. 25 shows a particle which most probably is not inside the spindle but glides on the border of the spindle and the cytoplasm. The curve of this particle Fig. 34C compared with the chromosome separation (Fig. 34D) indicate that the movement begins in middle



Figs. 31—33. Brownian movements—the paths of particles in the interzonal region during anaphase D—H (31—32) and in the cytoplasm (33). The arrow denotes the beginning of anaphase. In Fig. 33 the paths in the cytoplasm between two nuclei, the distance of which increases. The increase takes place in prophase and the outlines of the cell and the nuclei before and after separating is drawn. 31 *Leucosium*—cell No 254. 32 *Haemanthus*—cell No 1070. 33 *Clivia*—cell No 326

anaphase. The velocity is also of the same order as the velocity of the cytoplasm current. This explains why particles appear in the middle anaphase and in the interzonal region. Particles between two chromosome groups oscillate irregularly *till late anaphase* and in this stage almost all of them (about 85%) move quickly to the poles. During the movement they execute oscillations (Fig. 34). The course of the

movement closely resembles that in metakinesis and metaphase (before the movement to the poles the particles oscillate between the two chromosome groups (Figs. 31D—E), and at the end of the movement they oscillate either near the chromosome group or even between the chromosomes. The differences between the beginning and the end of the movement are seen in Figs. 30—34. It is remarkable that most of the particles begin to move simultaneously with the shortening

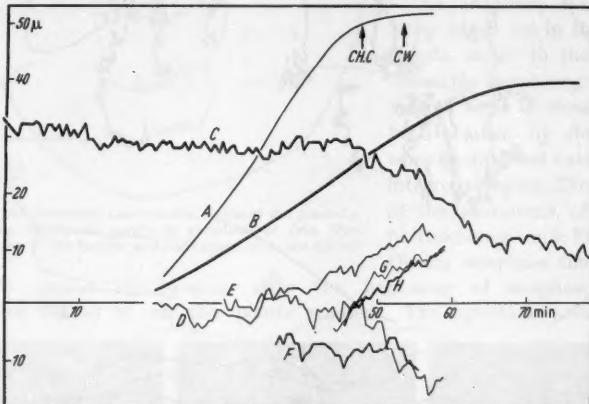


Fig. 34. Brownian movements. The distance of the particles from the middle of the interzonal region—abscissa chosen arbitrarily—C—H, and the distance between kinetochores in anaphase in the same cells A—B. C—moving particle and B—anaphase separation in *Haemanthus*—cell No 1070. D—H—Brownian movements and A—anaphase separation in *Leucocarpum*—cell No 254 (drawn in Fig. 31, micrographs Fig. 30). CH.C.—chromosome contraction, C.W.—cell wall formation

of the chromosome arms and cell wall formation (Fig. 30). This may suggest that the movement to the poles is caused by the chromosome contraction. However, some of the particles move with the velocity of the anaphase chromosomes before the chromosome contraction and the velocity of the arms or the nuclei contraction (Fig. 35) is much slower than the movement of the particles. This suggests that the movement of the particles to the poles in late anaphase is unconnected or only slightly connected with chromosome contraction.

During late anaphase some particles on the border of the interzonal region move not parallelly to the long spindle axis but slightly across it. This modification is caused by the cytoplasm current directed to the pole.

Fig. 33 represents a special case—the paths of the particles executing Brownian movements between two separating prophase nuclei. Such changes in the shape

and dimensions are very frequent and in this case the distance between the nuclei increased. The paths of the small particles, irregular at first, become directed more and more parallelly to the direction of separation. This suggests that during the separation of the nuclei the structure of the cytoplasm changes from *unorientated* to *orientated*. The path of the single particle is very long in comparison to the distance of nuclei separation in the same time. This indicates that the movement of the particles in this case is not passive and caused by the transportation of the particle during the nuclei separation.

IV. Discussion

During projection and analysis of the motion picture it is necessary to bear in mind "that such photographic representations give a vastly exaggerated impression of both the velocity and the distances that are involved" (SCHRADER 1953, pp. 55-56). The violent movements and currents described in this paper are in reality very slow and are violent only in comparison with other movements involved in cell division.

1. Chromosome movements

Contraction stage (C.S.). The existence of C.S. as a stage in which the kinetochores begin to pull the chromosomes is sufficiently proved by the observations here and previously reported. However the observations *in vivo* deal exclusively with plants with medium and large chromosomes. The problem arises whether C.S. exists in plants with very small chromosomes, where mechanical conditions are quite different. Further studies are necessary to solve this question definitely, but preliminary observations on *Colchicum*, where the chromosomes are very small, seem to indicate that this stage exists there and is followed, at least in some cases, by the movement of some chromosomes in metakinesis to the poles. Its course, thus, is similar to that in plants with large chromosomes.

Also the question arises whether C.S., appearing as a sudden compression of the chromosome group, exists in animal mitosis. As C.S. may last for a very

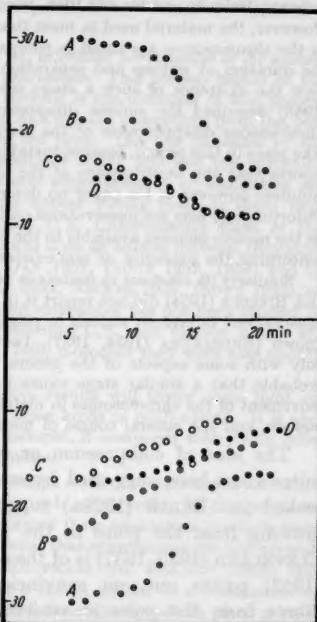


Fig. 35. The length of chromosome arms A, C and heights (B, D) of the chromosome group during early telophase plotted against time. The curves illustrate the shortening of chromosomes in early telophase for two chromosome groups. A *Haemanthus*—cell No 1074; others *Leucosium*, B—No 266, C, D—No 254

short time (a few minutes) only it is almost impossible not to overlook it in direct observations, and also in cine-micrographic studies, if the acceleration applied is too high. So far as can be judged from the literature it has not been described in animal mitosis; at least in the cine-micrographic analyses of mitosis in tissue cultures (HUGHES and SWANN 1948, BOSS 1954a, b, c) its existence is not suggested. However, the material used in most tissue cultures is unsuitable for such analysis, as the chromosomes are small in comparison with those found in endosperm and the duration of mitosis and separation is short. From the theoretical point of view the existence of such a stage seems to be possible. HUGHES and SWANN (1948) described the sudden disappearance of the nucleoli (about 1 min.) and simultaneous disappearance of the nuclear membrane. C.S., if it exists, should take place in this period, because metakinesis follows immediately. SWANN (1951a) reports that the birefringence of the mitotic spindle increases rapidly in a few minutes; however in his paper no description of chromosome behaviour is given. Unfortunately also the observations on the incomplete course of mitosis in animals on the motion pictures available to the present authors do not allow any conclusion concerning the existence or non-existence of C.S. in animals.

Similarly its existence in meiosis in plants and animals is not reported. JACQUEZ and BIESELE (1954) did not report it in the analysis of MICHEL's (1944) film. The observations *in vivo* on meiosis in plants are very incomplete. The records so far known [SHIMAKURA (1934, 1937), INOUÉ (1953), FUJI and YASU (1954)] deal only with some aspects of the general course of meiosis. Nevertheless it seems probable that a similar stage exists in plant meiosis, for the later stages—the movement of the chromosomes in metakinesis to the poles, especially in abnormal meiosis, and the general course of metakinesis—appear to be similar.

The idea of compression or contraction occurring in prophase of mitosis has been suggested by some authors, though most have overlooked it. BĚLAŘ (1929a) suggests the existence of spindle fibres growing from the poles to the plate and pushing the chromosomes. CLEVELAND (1935, 1937) is of the same opinion. However, as SCHRADER (1953) points out, no convincing proof of the growth of spindle fibres from the poles is available. The existence of some kinds of compression was reported by SCHÄEDE (1929a, b) and in the cine-micrographic studies of SCHNEIDER (1938, 1939). Their statements are not quite correct and have already been discussed (BAJER 1954a). BARBER (1939) however does not report a compression in his cine-micrographic work, though this is the only method for the analysis of C.S. Working on *Tradescantia* staminal hairs as did SCHNEIDER and BARBER, STRUGGER (1949) is aware of the existence of a contraction.

He writes: „Kurz vor der Auflösung (nuclear membrane) tritt eine auffallende ... Kontraktion des prophasischen Kerns ein, welche offensichtlich mit einer weiteren Verkürzung und Verdickung der Chromosomen verknüpft ist. Ist das Maximum der sehr schnell verlaufenden Kontraktion erreicht, so wird die Kernmembran aufgelöst, und die Chromosomen ordnen sich im nunmehr freien Kernraum allmählich zur Äquatorialplatte in gesetzmäßiger Weise um“ (p. 8).

JUNGERS (1931) also found that immediately after the disappearance of the nuclear membrane the chromosomes are very strongly compressed. WADA (1950) in his hypothesis of mitosis, accepts the existence

of a force acting from the poles and causing the partial arrangement of chromosomes in metakinesis.

There are some possible *explanations of the mechanism and the processes which take place during C.S.* On the basis of the present studies two seem possible.

1. During C.S. a sudden *crystallisation i.e. orientated arrangement of the spindle particles occurs*, or a process similar to a *gelification*. This process begins at the poles and *proceeds toward the plate*. Most striking is the direction of this process and its violence. The front of the changed half spindle proceeding from the pole pushes the chromosomes in the direction of the plate. This was indicated by the analysis of the dependence between the positions of the arm and the beginning of their movement to the plate. If the above suggestions on crystallisation are correct, birefringence of the spindle would appear during C.S. If there were gelification, clotting substances might affect C.S. Unfortunately most of the work on birefringence of the mitotic spindle was done on animal material (SCHMIDT 1937, 1939, SWANN 1951a, b, INOUÉ and DAN 1951, INOUÉ 1952, 1953) and in papers on plants (KUWADA and NAKAMURA 1934, BECKER 1939, INOUÉ 1953) no data are available. Also the effect of clotting substances has not been studied in such detail as to reach any conclusions concerning C.S., and various results are not in full agreement (HEILBRUNN 1952, p. 740), moreover they were also mainly derived from animal material.

It is evident, however, that only positive results will throw some light on C.S., as negative results would not exclude some kinds of gelifications. It is also probable that very exact studies on fixed material, if compared with living cells, would indicate some changes in the half spindles.

These assumptions seem to be in agreement with the statements of STICH (1954) who suggests the presence of all elements of structure in the prophase spindle and assumes that the factor which causes their orientation proceeds from the poles (centrosome). There is a general belief that centrosomes are not present in higher plants, but lately ÖSTERGREN, KOOPMANS and REITALU (1953) and ÖSTERGREN (1954) reported the existence of a centre similar to a centrosome in *Allium*, and the existence of organizers on the poles of the spindle in plant mitosis is known from earlier literature.

2. During the *disappearance of the nuclear membrane*—a process which may be fairly abrupt—the *nuclear sap and the substance of the "clear space" around the nucleus* (cf. p. 564) *begin to mix*. The surface tension of these two substances is probably different and if we assume (1) that the surface tension of the nuclear sap is higher than that of the "clear space", (2) that the nuclear membrane disappears suddenly, and (3) that these substances *mix at once*, we may then theoretically expect a course of C.S. such as we actually observe. The sudden disappearance of the nuclear membrane is proved, and also higher surface tension of the nuclear sap is probable. After the dissolution of the nuclear membrane the force which acts during the mixing of the two substances ("clear space" and nuclear sap) act in the direction to the centre of the nucleus. The intensity of the force acting on the nucleus is dependent on the amount of the liquid ("clear space") which surrounds it and the greater the local amount the greater will be the force from this direction. On the basis of these suggestions the differences in the course of C.S. will be easily understood: in flattened cells the contraction is usually slight as the mixing of the substances is more difficult; if the "clear space" is developed better at the polar regions, the contraction from that direction is stronger; also the differences between the two types of C.S. find an explanation. Changes in

the surface tension before C. S. are very probable, and may be indicated by changes in the shape of the nuclei from ellipsoidal to spherical in prophase, and contraction usually occurs in this stage. This may mean that either the surface tension of the nuclear membrane increases, or the surface tension of the "clear space" decreases, which seems much more probable. The duration of C. S. which is the longer the larger the nucleus is, also supports the above suggestions. For the final explanation further experiments are necessary.

The above suggestions concerning both crystallisation (gelification), surface tension and mixing explain only the process of contraction and not the process of straightening of the arms which follows.

Metakinesis and metaphase. The existence of two factors in metakinesis—one causing the movement of kinetochores to the plate and the second acting to the poles—was suggested by BĚLAŘ (1929b). He explained the straightening of the arms before metaphase by the growth of spindle fibres to the poles. According to SCHÄEDE (1929b) currents inside the spindle are responsible for it. From the present observations the existence of two forces which cause these movements is evident. The elimination of persisting nucleoli (YAMADA and SINOTO 1925, ZIRKLE 1928, FREW and BOWEN 1929, SCHÄEDE 1929a, GEITLER 1936, D'AMATO and GRAZIA 1952/53 and others) to the pole, usually before the separation of the chromosomes in anaphase, is also a good proof that the force to the pole exists. Further proofs are the micrurgical experiments of CARLSON (1952) who observed after the insertion of a needle in the half spindle near the metaphase plate a slow pushing of the needle to the pole. RHOADES and VILKOMERSON (1942) and ÖSTERGREN and PRAKKEN (1946) also found that such force may act on the chromosome ends of maize and rye respectively and suggest that the nature of this force is the same as that which acts on the kinetochores i.e. the fibre inserted in these mobile chromosome ends. Such an explanation of the mechanism of the straightening of the arms observed in this work *does not seem possible*. The force causing the straightening of the arms can change in direction and may act toward the plate. In order to explain the sudden bending and re-straightening of the arms this assumption is necessary, because the existence of yet another force acting temporarily in the direction to the plate seems improbable. The most characteristic features in the straightening and bending of the arms are the sudden beginning and ending of this process and the considerable velocities involved. It seems that this force begins to act a few minutes after the two half spindles, changed during C. S., have touched each other i.e. immediately after the appearance of a kind of new organization inside the spindle. For the explanation of the mechanism of the poleward acting force the suggestions of BĚLAŘ (1929a, b) and SCHÄEDE (1929b) do not seem possible. BĚLAŘ's assumption does not explain the sudden bending of the arms; and ob-

servations on the Brownian movements (BĚLAŘ 1929b, BECKER 1938, CARLSON 1946, BAJER 1953a), though they may throw light on the currents, are far from sufficient for definite proof (cf. the discussion on the currents p. 603).

According to the opinion of the present authors, the movements of the arms is proof of the *differentiation of the mitotic spindle structure in metakinesis* and after C.S. As a result of C.S. a uniform structure seems to appear and the changing of this structure into a non-uniform one causes the straightening of the arms. A short moment without motion before the beginning of anaphase may indicate that *the changes of the structure are finished*, which explains why anaphase does not begin at once. *Metaphase exists as a stage in morphologic and physiologic sense*. The best proof of the existence of the differentiations in the metaphase spindle are the studies of INOURI (1952a, 1953 and especially 1952 b) which indicate that some parts of the metaphase spindle are more highly birefringent than others. This hypothesis of the *differentiations of the structure before anaphase* was suggested earlier (BAJER (1953c). As a result of the differentiation in the spindle the change of character described for the phragmoplast (p. 588) may originate. It is quite probable that the direction of such differentiations may as well be quickly changed as they may suddenly originate and cease. In different parts of the half spindle they may also act simultaneously in opposite directions. The hypothesis of gradients suggested lately by STICH (1954) may also explain the above described movement, but for any final acceptance further experimental proof is necessary.

In conclusion it may be stated that the existence of these two forces acting respectively on the kinetochores and the arms is proved in metakinesis, but a satisfactory explanation of the nature of the second one cannot be given at present.

The movement of some metakinetic chromosomes to the poles over long distances and their return to the plate has been reported so far only in one previous paper (BAJER 1954a). The drawings of JUNGERS (1931) and SCHÄDEB (1929b) give some indications of such movements, but they have not been discussed, probable only due to the strangeness of this fact. The movement may be explained by the delay of the moment of activity of the kinetochores, or a new uniform process of gelification which may touch the chromosome from one side only. The frequent movement to the poles of the chromosomes which are in the centre of the chromosome group may suggest this last explanation. This seems the best explanation of movements over short distances. It is also possible that orientation of chromosomes governs this movement and morphologic studies may solve this question. Anyhow the behaviour of kinetochores indicates their active role in this movement.

The assumption of the existence of currents in the spindle does not offer a good explanation.

The movement of kinetochores in metakinesis during the metaphase plate stabilisation in most non-flattened cells is approximately parallel to the spindle axis. BĚLAŘ (1929a) suggested an explanation of such a direction of movement. However, in the flattened cells it is impossible to predict the direction of movement and often movement across the spindle was observed. In some cases the movement across the spindle was also observed in non-flattened cells. The existence of such a movement was assumed by ÖSTERGREN (1948a) to explain the *Luzula* case.

The analysis of metaphase confirms the suggestions that it is a stage of equilibrium. The forces active in metakinesis do not, however, cease to change their intensity. Stabilisation of the plate is not necessary for regular chromosome distribution and usually it is easily understood why mechanical conditions in the flattened cell prevent stabilisation, but in some cases it is difficult to explain why the separate chromosomes do not enter the chromosome group.

One of the most striking features of metaphase or late metakinesis is the "waiting" for the start of anaphase, when the chromosomes return from the pole. It seems possible that the *movement to the plate has also physiological consequences*. In view of the above hypothesis (origin of the new structure in metakinesis) it can be easily understood that the *movement to the plate makes the final construction impossible*.

Anaphase. The observations on the deviations of the course of anaphase reported in this and in a previous paper (BAJER 1954a), and many others not published (they concern mainly different modifications of the normal course of mitosis observed in flattened endosperm cells), tempt one to draw some general conclusions.

In the mechanism of mitosis there are some main and subsidiary factors which are responsible for the chromosome movements, and these subsidiary mechanisms may be liberated in special conditions. The above suggestion seems to be supported by SCHRADER's (1953) statement. He writes "the final solution of the mitotic problem will also certainly make use of parts of several different hypotheses" (p. 108). E.g. in *Hymenophyllum* (BAJER and MOLÈ-BAJER 1953a, b) the shock action of high temperature (40–50° C) causes a longer separation of the chromosomes in anaphase, but only if applied in middle or late anaphase and not earlier. The shape of the separated chromosome groups may indicate such a mechanism of separation. This action may be also liberated by chemical factors. HOFFMAN-BERLING (1954a, b, c) was able to induce not only the pushing body action but also cytokinesis in models from specially prepared cells. Another example is the movement of the arms in advance of the kinetochores in flattened endosperm cells, which may lead in extreme cases to a mitosis similar to that in *Sciara* (METZ 1926). Also, if the suggestions that (1) endomitosis (p. 583) is caused by the mechanical conditions and (2) fusion of the transport mechanisms of some anaphase chromosomes into one are correct, then they are different aspects of the same mechanism, and only the action of different factors is quantitatively different.

The same argument concerns the lagging of chromosomes in anaphase. As in endosperm different modifications were observed solely by the change in mechanical conditions during flattening, it would be strange to assume that the nature of the mechanism changed from case to case. This suggests that all, or almost all, *disturbances and modifications of mitosis are governed by the same kinds of mechanisms, in which one factor overcomes the other*. In the view of the above enumerated facts it seems that a full and complete hypothesis of mitosis must explain normal movements, the meiotic disturbances, the *Brachystethus* (SCHRADER 1947), the *Sciara* (METZ 1926) and the *Luzula* (ÖSTERGREN 1949a) cases, and most of the modifications described by CLEVELAND (1952).

2. Cytoplasmic movements

Cytoplasmic movements in mitosis were described long ago, but they mainly concern animal cells. The lack of knowledge in this respect in plants is stressed by many authors, lately by MICHAELIS (1954), and so far only a few authors have dealt with this problem in plant mitosis *in vivo*. Using the cine-micrographic method, SCHNEIDER (1938, 1939), BARBER (1939), and STRUGGER (1949) studied cytoplasmic movements during mitosis in the *Tradescantia* cell, and some notes are given by WADA (1950) also in *Tradescantia*. BARBER found that "whilst the chromosomes are contracting to form the telophase nuclei, the whole cell undergoes very vigorous cytoplasmic movement. Granules appear to flow down from the poles and penetrate between two telophase nuclei into the spindle region. They may show vigorous Brownian movements" and this movement lasts 5–10 mins. only. BĚLAŘ (1929a) in *Stenobothrus* also gives a similar description, though he stresses that he could not find such movements in *Tradescantia*—an object on which SCHNEIDER and BARBER also worked. SCHNEIDER (1938) observed the cytoplasmic current from the pole and suggested that the current turns to the pole and causes further separation of chromosomes in anaphase. GEITLER (1936) also suggests active influence of cytoplasm on the separation in telophase.

In this work the *cytoplasmic movements* were observed in cells under different mechanical conditions which permit the drawing of some general conclusions on the *mechanism* of this movement. The assumption of *piston action of the anaphase chromosome group* (p. 587) as the *cause of cytoplasm currents* in mitosis gives an answer to the following questions: (1) why in flattened cells the cytoplasm currents are weaker than in not flattened ones, and (2) why the first stage of movement (the movement from the poles) begins in middle anaphase. According to this explanation the *cytoplasm movement from the poles would be caused by the movements of chromosomes* i.e. the movement is a passive one; this is contrary to the explanation given by SPEK (cited from SCHRADER 1953) on active "Fontänenströmung". Similarly the *cytoplasmic move-*

ment perpendicularly to the spindle axis appearing already at the moment when the movement from the poles still goes on, *is also passive and is the result of the pressure of the new mass of cytoplasm flowing from the poles.* SCHNEIDER (1938), after observations of the cytoplasmic current from the pole, came to the conclusion that the phragmoplast originates not from the interzonal region but from the cytoplasm. GOTTSCHALE (1954) is of the same opinion. Without doubt, in some cases the phragmoplast may originate exclusively from the cytoplasm. The lobes of endosperm are excellent material for such observations and the process of phragmoplast formation may be observed in them to the finest details. However, during mitosis a part of the phragmoplast arises from the interzonal region which is in accordance with BĚLAŘ's observations (1929a)—though SCHNEIDER (1938) disagrees—that outer parts of it are probable cytoplasmic in origin. The appearance of small particles in the interzonal region in the middle anaphase, simultaneously with the beginning of the cytoplasmic movements from the poles indicates that the granular part of the cytoplasm is transformed into the phragmoplast.

The movement of the cytoplasm to the poles i.e. the last of the cytoplasmic currents is at least partly caused by the contraction of the chromosome arms during early telophase and probably by the changes of the phragmoplast at the border of the chromosome group i.e. by the process during which the connection between the chromosome groups and the phragmoplasts is interrupted. The action of the cytoplasm as a kind of contraction ring would indicate such a course of this process. According to this explanation such a kind of movement would also be a passive one.

This suggests that the interpretation of the last phase of the cytoplasm movement must be extraordinarily cautious. Probably it is caused by several factors. In some cases, however, the movements of cytoplasm to the poles also seem to be active ones and influence the separation of telophase nuclei. In general *primary cytoplasmic movement found in plant mitosis is a passive one and is evoked by the chromosome movements.*

3. Brownian movements

The results of observations on brownian movements are unexpected. The fact that oscillating Brownian movements parallel to the spindle axis occur more readily than perpendicular to it was reported by HEILBRUNN (1922, cited from HEILBRUNN 1952), BĚLAŘ (1929a, b), BECKER (1938), CARLSON (1946), and BAJER (1953a). The directed movements to the poles or in the opposite direction have not so far been observed for such small particles.

BĚLAŘ (1929b), describing the metaphase, writes: „daß das Verhalten dieser Granula kein Anzeichen einer Strömung innerhalb der Spindel erkennen ließ: die Körnchen bewegen sich so als ob sie sich in einem ruhenden Medium befänden“ (p. 92) . . . „die Granula findet man auch während der Anaphase in der Spindel . . . und wenn man sie gerade ins Auge faßt, so stellt man fest, daß sie gerade so „unbekümmert“ herumtanzten, wie während der Metaphase; sie machen die Bewegung der Chromosomen nicht mit“ (p. 99).

Observations of this kind on larger moving particles have, however, been reported. Small persisting nucleoli probably undergo this kind of movement, and also particles of the kind described by LEVAN (1944), in *Bellevalia*. Recently STICH (1954) described a beautiful case of the movements of the particles in the spindle of *Cyclops* and his results are fully supported by the observations reported in this paper. So the directed movement of small particles inside the spindle seems to be sufficiently proved in mitosis. The problem arises as to whether the directed movement of small particles indicates currents in the spindle. The existence of such currents has been suggested by some authors e.g. SCHÄDE (1929b) and lately PFEIFFER (1951). The mode of Brownian movement in the half spindle even during particle elimination is very non-uniform, jerky and often simultaneous in different directions. *To explain it by regular currents would make it necessary to assume that they arise and cease suddenly, which seems improbable.* Changes of direction toward the poles or the plate of a physico-chemical factor (affecting structural, viscosity, or surface tension change) which may take place in a small part of the spindle and simultaneously in different directions, offer a more probable explanation and might be applied as well to the half spindles as to the interzonal region. Such changes in the character of periodic movement to the poles was found in the phragmoplast (p. 588). The existence of such a process in the phragmoplast of every cell is very probable, though it is not always visible because special mechanical conditions seem to be necessary to see it distinctly. According to this explanation the periodic movement causes the regular elimination of particles to the poles in early telophase, though the contraction of the chromosome arms occurring in early telophase may also take some part in this process. A pushing body action similar to that described by RIS (1943) was proved in previous papers (BAJER 1953a, b and BAJER and MOLÉ-BAJER 1954). It might be suggested that the pushing apart of the whole half spindles with the chromosomes is the real cause of the movements of the particles in telophase. However, this is not the case, for the moment when most of the particles move to the poles begins usually some minutes after the pushing body action ceases and elimination of the particles is observed in all cells, even in flattened ones, where the action of the pushing body toward the pole is usually very weak.

Summary

The course of mitosis in endosperm was studied in plants with medium and large chromosomes by the cine-micrographic method; 3 main problems were considered: 1. chromosome movements, 2. cytoplasmic currents, 3. Brownian movements.

1. Chromosome movements

a) In all plants the moment at which the interaction between the kinetochores and the spindle begins is recognisable as a contraction stage (C.S.). Two types of C.S., usually dependent on mechanical conditions, were distinguished and suggestions of its mechanism are given. An analysis of nucleolus structure and behaviour was made and the paths of the kinetochores during C.S., metakinesis and metaphase were traced.

b) The most characteristic feature of metakinesis is: the movement of the kinetochores to the plate, which may be preceded by shorter or longer poleward movements, and the violent straightening of the arms to the poles. Anaphase does not begin until the chromosomes have returned to the plate. It is suggested that the spindle differentiation begins in C.S. or early metakinesis and partly lasts until metaphase; when differentiation is finished anaphase begins. The existence of two forces in metakinesis—acting on the kinetochores and on the arms—is postulated.

c) In metaphase, movements across the spindle, and in anaphase, some irregularities were described and from them some general conclusions concerning the mechanism of mitosis were derived (p. 600).

2. Cytoplasmic currents

Distinct movements of the cytoplasm begin in middle or late anaphase. A slow current from the pole accumulates cytoplasm in the equator of the cell, the mass of cytoplasm in the later stages presses on the interzonal region, while the current from the pole ceases simultaneously. The final poleward movement or movement in the direction of the new nuclei is more or less distinct. The intensity of each of these phases is dependent on the mechanical conditions in the cell. Observations on cells with different mechanical conditions lead to the conclusion that the movement is a passive one and is caused by the chromosomes moving to the pole (pushing body action) and then by the formation of the nuclei in telophase.

3. Brownian movements

Analysis of the paths of the particles executing Brownian movements indicates that there is not only a preferred direction of such movements parallel to the spindle axis, but also that the particles in the half spindles

before the beginning of anaphase can move both to the pole and to the plate. In anaphase the particles appear in the interzonal region and first oscillate there more or less regularly, and then, in late anaphase or early telophase during phragmoplast formation, move as a rule to the poles. Observations of the peculiar kind of movements in the phragmoplast led to some suggestions as to the mechanism of the unexpected behaviour of such tiny particles.

References

BAJER, A.: Studies on the spindle and chromosome movement. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **21**, 99—111 (1951). — Absolute viscosity and living mitotic spindle structure. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **22**, 331—348 (1953a). — Endosperm valuable material for experimental studies of mitosis *in vivo*. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **22**, 475—482 (1953b). — Observations on spindle structure and persisting nucleoli. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **22**, 653—666 (1953c). — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. I. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **23**, 333—412 (1954a). — The endosperm a new material for experimental studies of mitosis *in vivo* with examples of its application and a motion picture demonstration. *Proc. VIIIth Int. Bot. Congress*. Sec. 9—10, pp. 95—96. Paris 1954b. — Living smears from endosperm. *Experientia* **11**, 221 (1955). — BAJER, A., and J. MOLÉ-BAJER: Influence of extreme temperatures on mitosis *in vivo*. I. *Hymenophyllum*. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **22**, 267—298 (1953a). — Influence of extreme temperatures on mitosis. II. *Hymenophyllum*. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **22**, 577—586 (1953b). — Endosperm—material for study on the physiology of cell division. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **23**, 69—110 (1954). — BARBER, H. N.: The rate of movement of chromosomes on the spindle. *Chromosoma* **1**, 33—50 (1939). — BECKER, W. A.: Über einige Streitfragen der Zellteilung. *Z. Zellforsch.* **28**, 253—260 (1935). — Recent investigations *in vivo* on the division of plant cell. *Bot. Rev.* **4**, 446—472 (1938). — Struktur und Doppelbrechung der Chromosomen. *Arch. exper. Zellforsch.* **29**, 196—200 (1939). — BÍLÁK, K.: Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. II. *Arch. Entw.mechan.* **118**, 359—484 (1929a). — Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. III. *Z. Zellforsch.* **10**, 71—134 (1929b). — BOSS, J.: Mitosis in cultures of newt tissues. I. *Exper. Cell Res.* **7**, 215—231 (1954a b). — Mitosis in cultures of newt tissues. III. *Exper. Cell Res.* **7**, 443—456 (1954c). — BRINK, R. A., and D. C. COOPER: The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* **13**, 423—541 (1947). — CARLSON, J. G.: Protoplasmic viscosity changes in different regions of the grasshopper neuroblast during mitosis. *Biol. Bull.* **90**, 109—121 (1946). — Microdissection studies of the dividing neuroblast of the grasshopper, *Chortophaga viridifasciata*. *Chromosoma* **5**, 199—220 (1952). — CLEVELAND, L. R.: The centriole and its role in mitosis as seen in living cells. *Science* **81**, 598 (1935). — Origin and development of the achromatic figure. *Biol. Bull.* **74**, 41—45 (1938). — The whole life cycle of chromosomes and their coiling systems. *Trans. Amer. Phil. Soc.* **39**, 1—100 (1949). — Studies on chromosomes and nuclear division. *Trans. Amer. Phil. Soc.* **43**, 809—869 (1953). — D'AMATO-AVANZI e M. GRAZIA: Nuove osservazioni sulla persistanza del nucleolo durante la mitosi nel genere *Cassia*. *Cariologia* **5**, 133—135 (1952/53). — EHRENBERG, L.: Influence of temperature on the nucleolus and its conservative nature. *Hereditas* **32**, 406—418 (1946). — FREW, P. E., and R. H. BOWEN: Nucleolar behaviour in the mitosis of plant cells. *Quart. J. Microsc. Sci.* **73**, 197—214 (1929). — FUJII, K., and K. YASUI: Meiotic processes from the first prometaphase to the end of the second division of the

P.M.C. *Cytologia* **19**, 54—76 (1954). — GEITLER, L.: Vergleichende Untersuchungen über den feineren Kern und Chromosomenbau der *Cladophoraceen*. *Planta* **25**, 530—578 (1936). — GOTTSCHALK, W.: Die Ausbildung des Phragmoplasten während des Ablaufs der Meiosis. *Naturwiss.* **41**, 307 (1954). — HEILBRUNN, L. V.: An outline of general physiology, p. 818. Philadelphia: W. B. Sounders Comp. 1952. — HOFFMANN-BERLING, H.: Die Bedeutung des Adenosintriphosphat für die Zell- und Kernteilungsbewegungen in der Anaphase. *Biochim. et Biophysica Acta* **15**, 226—236 (1954a). — Die Glycerin-Wasserextrahierte Telophasezelle als Modell der Zytokinese. *Biochim. et Biophysica Acta* **15**, 332—339 (1954b). — Adenosintriphosphat als Betriebsstoff von Zellbewegungen. *Biochim. et Biophysica Acta* **14**, 181—194 (1954c). — HUGHES, A. F.: The mitotic cycle, p. 236. New York 1952. — HUGHES, A. F., and M. M. SWANN: Anaphase movement in the living cell. *J. of Exper. Biol.* **25**, 45—70 (1948). — INOUÉ, S.: The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. *Exper. Cell Res. Suppl.* **2**, 305—318 (1952a). — Effect of temperature on the birefringence of the mitotic spindle. *Biol. Bull.* **103**, 316 (1952b). — Polarisation optical studies of the mitotic spindle. *Chromosoma* **5**, 487—500 (1953). — INOUÉ, S., and K. DAN: Birefringence of the dividing cell. *J. of Morph.* **80**, 423—456 (1951). — JACQUEZ, J. A., and J. J. BIESELE: A study of MICHEL's film on meiosis in *Psophus stridulus* L. *Exper. Cell Res.* **6**, 17—29 (1954). — JUNGERS, W.: Figures caryocinétiques et cloisonnement du protoplasma dans l'endosperme d'*Iris*. *Cellule* **40**, 293—353 (1931). — KAMIYA, N.: The motive force responsible for protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium. *Ann. Rep. Sci. Works, Osaka Univ.* **1**, 53—83 (1953). — KUWADA, Y., and T. NAKAMURA: Behaviour of chromonemata in mitosis. IV. *Cytologia* **6**, 78—86 (1934). — LETTRE, R., u. W. SIERS: Zur Struktur des Nucleolus. *Naturwiss.* **41**, 458 (1954). — LEVAN, A.: Notes on the cytology of *Dipcadi* and *Bellevavia*. *Hereditas* **30**, 217—224 (1944). — MARTENS, P.: Recherches expérimentales sur la cinése dans la cellule vivante. *Cellule* **38**, 69—174 (1927). — METZ, W. C.: An apparent case of monocentri mitosis in *Sciara*. *Science* **63**, 190—191. — MICHAELIS, P.: Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance. *Adv. Gen.* **6**, 288, 401 (1954). — MICHEL, K.: Hochschulfilm C 443/1944 der Reichsanstalt für Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht. 1944. — MOLÈ-BAJER, J.: A simple method for examining the action of chemicals on mitosis in living endosperm. *Acta Soc. Bot. Poloniae* **24**, 619—625 (1955). — NAKAMURA, T.: Double refraction of the chromosomes in paraffine sections. *Cytologia Fuji Jub. vol.* **1937**, 482—493. — ÖSTERGREN, G.: *Luzula* and the mechanism of chromosome movement. *Hereditas* **35**, 445—468 (1949a). — A survey of factors working at mitosis. *Hereditas* **35**, 525—528. — The mechanism of coorientation in bivalents and multivalents. *Hereditas* **37**, 85—136 (1951). — Astral rays in normal and chemically disturbed mitosis of higher plants. *VIIIe Congr. Int. Bot. Sec.* 9—10. p. 15—16. Paris 1954. — ÖSTERGREN, G., A. KOOPMANS and J. REITALU: The occurrence of the amphiastral type of mitosis in higher plants and the influence of aminopyrin on mitosis. *Bot. Notiser* **28**, 417—419 (1953). — ÖSTERGREN, G., and R. PRAKKEN: Behaviour on the spindle of the activity mobile chromosome ends of rye. *Hereditas* **32**, 495—513 (1946). — PFEIFFER, H. H.: Polarisationsoptische Untersuchungen am Spindleapparat mitotischer Zellen. *Cytologia* **16**, 194—200 (1951). — PUNNETT, H. H.: Cytological evidence of hexaploid cells in maize endosperm. *J. Hered.* **44**, 257—259 (1953). — RHOADES, M. M., and H. VILKOMERSON: On the anaphase movement of chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **28**, 433—436 (1942). — RIS, H.: A quantitative study of anaphase movement in the aphid *Tamalia*. *Biol. Bull.* **85**, 90—106 (1943). — SCHÄEDE, R.: Über das Verhalten des Nucleolus während der Kernteilung. *Protoplasma* **5**, 41—54 (1929a). — Kritische Untersuchungen über die

Mechanik der Karyokinese. *Planta* 8, 383—397 (1929b). — SCHMIDT, W. J.: Doppelbrechung von Chromosomen und Kernspindel und ihre Bedeutung für das kausale Verständnis der Mitose. *Arch. exper. Zellforsch.* 19, 352—360 (1937). — Doppelbrechung der Kernspindel und Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung. *Chromosoma* 1, 253—264 (1939). — SCHNEIDER, B.: Zellteilung der Pflanzenzelle in Reihenbild. *Z. Zellforsch.* 28, 829—860 (1938). — Die Plasmaveränderungen bei der Pflanzenzelleitung. *Arch. exper. Zellforsch.* 22, 298—303 (1939). — SCHRADE, F.: Data contributing to an analysis of metaphase mechanics. *Chromosome* 8, 22—47 (1947). — Mitosis. Sec. ed., pp. 170. New York: Columbia Univ. Press 1953. — SHIMAKURA, K.: The capability of continuing divisions of the *Tradescantia* pollen mother cells in sucrose solution. *Cytologia* 5, 363—372 (1934). — The chromomemata observed in the fresh P.M.C.s of *Trillium kamtschaticum* Pall. mounted with sucrose solution. *Cytologia* Fuji Jub. vol. 1937, 256—261. — STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. *Chromosoma* 6, 199—236 (1954). — STRUGGER, S.: Kern- und Zellteilung bei *Tradescantia virginica* L. Hochschulfilm C 559/1949. Inst. f. Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht. 1949. — SWANN, M. M.: Protoplasmic structure and mitosis. I. *J. of Exper. Biol.* 28, 417—433 (1951a). — Protoplasmic structure and mitosis. II. *J. of Exper. Biol.* 28, 334—344 (1951b). — THERMAN, E.: The effect of indole-3-acetic acid on resting plant nuclei. I. *Allium cepa*. *Ann. Acad. Sci. fenn. Ser. A* 1951, 1—40. — TJO, J. H., and A. LEVAN: Chromosome analysis of three hyperdiploid ascites tumours of the mouse. *Kungl. Fysiol. sällsk. Handl.* 65, 1—38 (1954). — YAMAHA, G., and Y. SINOTO: On the behaviour of nucleolus in the somatic mitosis of higher plants with microchemical notes. *Bot. Mag. Tokyo* 39, 205—219 (1925). — WADA, B.: The mechanism of mitosis based on studies of the submicroscopic structure and of the living state of the *Tradescantia* cell. *Cytologia* 16, 1—26 (1950). — ZIRKLE, C.: Nucleolus in root tip mitosis in *Zea Mays*. *Bot. Gaz.* 86, 402—418 (1928).

Dr. A. BAJER and J. MOLĘ-BAJER, Laboratory of Plant Physiology,
Jagellonian University, Grodzka 53, Cracow, Poland

Aus dem Zoologischen Institut der Justus-Liebig-Hochschule Gießen

DIE MEIOSE IN DER SPERMATOGENESE
VON APHROPHORA SALICINA (GOEZE)*

Von

GISELA ILLERT

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Januar/23. August 1955)

A. Einleitung

Untersuchungen, die sich mit der Spermatogenese der *Auchenorrhyncha* (*Homoptera*) befassen, sind relativ spärlich. Sie beziehen sich, außer einer wenig ausführlichen Arbeit von BORING (1913) über *Philaenus spumarius*, auf außereuropäische Arten. STEVENS (1906), BORING (1907, 1913), BORING und FOGLER (1915) beschreiben zudem nur Zahl und Größenverhältnisse der Chromosomen. Erst KORNHAUSER (1914) bringt wesentliche Einzelheiten der meiotischen Prophase von 2 Membracidenarten. Während STEVENS, BORING, BORING und FOGLER bei den von ihnen untersuchten *Auchenorrhyncha*-Arten im männlichen Geschlecht immer nur den XO-Typus fanden, konnte KORNHAUSER in dieser Gruppe auch das Vorkommen eines XY-Typus feststellen. Das gleiche beschreiben MISRA (1937) und KUROKAWA (1953) bei verschiedenen japanischen *Aphrophora*-Arten. Die Arbeit von SHAFFER (1920) über die Spermatogenese und Oogenese bei *Cicada septendecim* schildert erstmalig bei Homopteren das Vorkommen einer diffusen Phase der Chromosomen im Anschluß an das Diplotan. Besonderheiten der Meiose von *Auchenorrhyncha*-Arten haben SCHRADER und LEUCHTENBERGER (1950) und HELENIUS (1952) mitgeteilt.

In der vorliegenden Arbeit werden die verschiedenen Stadien der Reifungssteilungen in der Spermatogenese bei *Aphrophora salicina* GOEZE beschrieben. Der Tetradengenese und dem Verhalten der Geschlechtschromosomen im Verlauf der Meiose wurde besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

B. Material und Methode

Das Untersuchungsmaterial wurde 1952 und 1953 in den Monaten Mai bis August auf der Rheininsel Kühkopf bei Lülfelden gesammelt.

Für das Studium der Spermatogenese erwiesen sich die Hoden adulter Larven und die frisch geschlüpften Imagines als am geeignetesten. Man findet in ihnen alle meiotische Stadien bis zu den Spermatiden in reichlicher Anzahl, ebenfalls Spermatogonienmitosen.

Die herauspräparierten Hoden wurden teilweise in toto fixiert, teilweise zu Austrichen verarbeitet. Die Ausstrichpräparate der männlichen Gonaden wurden nach Osmiumsäureräucherung mit Flemming-Heitz, oder Benda fixiert. Für

* Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Technischen Hochschule in Darmstadt begonnen und im Zoologischen Institut der Justus-Liebig-Hochschule in Gießen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. E. ANKEL durchgeführt. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. ANKEL, danke ich herzlich für sein lebendiges Interesse an dieser Arbeit und für alle Hilfen.

Schnittpräparate wurde nach SANFELICE, HELLY und BOUIN fixiert. Die Schnittdicke betrug in allen Fällen 5μ . Die Kerne wurden nach FEULGEN, mit oder ohne Gegenfärbung mit Lichtgrün, oder nach HEIDENHAIN (Schnellmethode nach TUAN) gefärbt.

C. Befunde

I. Die Vermehrungsperiode

Die Metaphasen der Spermatogonienteilungen zeigen 30 Chromosomen ($28 + XY$). Die morphologischen Unterschiede der Autosomen sind gering. Das Y-Chromosom ist das kleinste und hängt dem X, das in Form und Größe einem mittleren Autosome entspricht, ähnlich einem Satelliten, an. Alle Chromosomen sind als holokinetische



Abb. 1



Abb. 2



Abb. 3

Abb. 1. Metaphase einer frühen Spermatogonienmitose. Die Chromosomen sind dünn und chromatinarm. Die Geschlechtschromosomen liegen an der Kernperipherie. Etwa 1900mal

Abb. 2. Letzte Metaphase einer Spermatogonienmitose vor den Reifeteilungen. Die Chromosomen erscheinen als dicke, schwach gebogene Stäbchen, die Geschlechtschromosomen in charakteristischer Anordnung. Die homologen Chromosomen zeigen die Tendenz einer Assoziation der einander entsprechenden Partner. Etwa 1900mal

Abb. 3. Anaphase einer Spermatogonienmitose. Die beiden Geschlechtschromosomen X und Y zeigen eine Verzögerung ihrer Chromatidentrennung. Etwa 2200mal. Feulgen-Lichtgrün

Elemente in ihrer ganzen Länge der Äquatorialplatte eingeordnet. Während der Anaphase trennen sich X und Y später als die Autosomenchromatiden (Abb. 3).

Auf Querschnitten durch die einer Cyste entstammenden Spermienbündel lassen sich 124—127 Spermien auszählen. Demnach laufen 5 Goniemitosen ab.

Die Chromosomen in der Metaphaseplatte der letzten Goniemitose sind viel dicker, als in den Metaphasen der früheren Goniemitosen (Abb. 1). Von welcher Generation an sich die Metaphasechromosomen derart verändern, war nicht festzustellen. In den Metaphasen sowohl der frühen als auch der späten Goniemitosen zeigen die homologen Chromosomen eine Tendenz zur Assoziation (Abb. 2). In den Metaphaseplatten früher Spermatogoniengenerationen sind die homologen Chromosomen nur zum Teil somatisch gepaart; stark ausgeprägt tritt dieser Zustand erst in der letzten Mitose vor den Reifeteilungen auf. Wie die Verhältnisse in den somatischen Kernteilungen liegen, konnte aus Mangel an geeigneten Stadien nicht nachgeprüft werden.

II. Die Wachstumsperiode

Bei *Aphrophora salicina* ist nach dem Abschluß der letzten Spermato-
gonienmitose keine prämeiotische Interphase zu beobachten; die Tel-
ophase der Mitose geht unmittelbar in das Leptotänstadium über.

Leptotän. Zu Beginn der Prophase sind die Chromosomen außer dem X unsichtbar (Abb. 4). Die Zahl der Nukleolen variiert von 1—3. In diesem Stadium fällt das X als heterochromatischer Körper auf. In den frühen Leptotänstadien ist es ein Faden, der schlingenförmig in das



Abb. 4

Abb. 4. Frühes Leptotän. Das positiv heteropyknotische X-Chromosom ragt schlingenförmig in das Kernlumen hinein. Etwa 2200mal



Abb. 5

Abb. 5. Pachytän. Die Nukleolen sind an der Umbie-
gungsstelle eines konjugierten Chromosomenpaars
befestigt. Etwa 2300mal

zu verkürzen und liegt schließlich als stark färbbarer Komplex an der Kernperipherie. Ein Längsspalt ist in diesem Stadium nur schwach angedeutet.

Pachytän. Die Konjugation ließ sich nicht beobachten; die Chromosomenpaarung muß bereits im diffusen Stadium stattgefunden haben, denn das erste klare Stadium ist ein typisches Pachytänbukett. Die Enden der Chromosomen sind nach der Stelle der Kernperipherie zu orientiert, an der das Heterochromosom liegt, während die Chromosomenschleifen hufeisenförmig den Kernraum durchziehen. Das Nukleolpaar dürfte an der Umbiegungsstelle eines bestimmten Auto-
somenpaars liegen (Abb. 5). Eine charakteristische Einschnürung an einem homologen Paar, die für eine Nukleolusbildung verantwortlich sein könnte, ist auch an Diplotänchromosomen und späteren Stadien niemals festzustellen.

Die Bukettorientierung der Chromosomen löst sich gegen Ende des Pachytäns auf, und die konjugierten Partner liegen über den Kernraum verteilt. Der Übergang zum Diplotän erfolgt offenbar sehr rasch.

Diplotän. Sobald die Bukettorientierung verschwunden ist, sind die distinkt hervortretenden Homologen voneinander getrennt. Nur an ein-

Kernlumen hineinragt; die beiden Enden sind der Stelle der Kernmembran zugekehrt, nach der sich die Autosomen während des eigentlichen Bukettstadiums orientieren. Das X kann auch als ungekrümmter Faden oder in unregelmäßiger Haken- und Hufeisenform erscheinen. Während des weiteren Entwicklungsverlaufs beginnt sich das X-Chromosom

zernen Stellen sind die homologen Komponenten noch umeinander gewunden; zum Teil zeigen sie deutliche Chiasmen. Nur einzelnen Paaren scheinen sie zu fehlen.

Das X-Chromosom zeigt in dieser Phase keinerlei Besonderheiten mehr in bezug auf seine färberische Darstellung. Das Y liegt an dem Ende des X durch eine feine, ganz schwach färbare Brücke mit diesem verbunden. Diese Anordnung bleibt durch alle Stadien bis einschließlich der Metaphase der ersten Reifeteilung bestehen.

Die Trennung der Geschwisterchromatiden wird bei *Aphrophora salicina* erst im späten Diplotän, bzw. in der frühen Diakinese sichtbar,

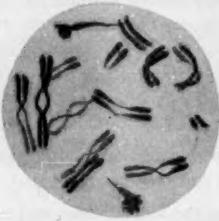


Abb. 6

Abb. 6. Spätes Diplotän. Die Chromosomen beginnen sich zu kontrahieren, die Chiasmen zu terminalisieren. Etwa 2600mal



Abb. 7

Abb. 7. Diffuses Stadium. Die Chromosomen verlieren ihre Färbbarkeit sehr stark. Jede Chromatide ist von einem schwach Feulgen-positiven Hof umgeben. Die Chiasmen sind zu diesem Zeitpunkt terminalisiert. Etwa 2600mal

sobald die Chiasmen terminalisiert worden sind. Es handelt sich hier um ähnliche Verhältnisse wie bei *Tamalia* (RIS 1942). In der nun folgenden Phase beginnen die Chromosomen sich zu kontrahieren, wie es in Abb. 6 dargestellt wird. Die Chiasmen werden bei den einzelnen Bivalents verschieden schnell terminalisiert. Wahrscheinlich beruhen diese Unterschiede jedoch auf dem primär verschiedenen Ort der Chiasmen, die teils nahe dem einen Ende oder näher zu der Tetradenmitte angelegt waren. Ein besonders weit fortgeschrittenes Terminalisationsstadium ist bei dem Bivalent in Abb. 6 in der Mitte des Kernes zu beobachten. Ursprünglich war dieses eine Kreuztetraden, aber das Chiasma wurde so weit gegen die Chromosomenenden verschoben, daß das Vorhandensein der chiasmadiastalen Chromosomenabschnitte nur noch durch einen ganz kleinen Knick in der Mitte des Bivalents ange deutet wird. Wieder andere Bivalente zeigen ganz deutliche Chiasmen, die bis zu ihrer vollständigen Terminalisierung noch eine große Strecke zu durchlaufen haben. Auch in diesen Kernen findet man wieder Chromosomen, die lediglich parallel konjugiert waren. Die XY-Tetraden ist in ihrer charakteristischen Anordnung ebenfalls deutlich zu sehen.

Diakinese. Der Lage und Anordnung der Chiasmen entsprechend, sind in der frühen Diakinese Stab-, Kreuz- und in seltenen Fällen auch Ringtetraden zu beobachten. Die Bivalente kontrahieren sich zunächst nicht weiter, sondern durchlaufen eine eigentümliche Auflockerungsphase. Die Chromosomen verlieren stark an Färbbarkeit, sie strecken sich und weichen etwas auseinander; der Spalt in den Dyaden wird dabei deutlich sichtbar. Von den im Diplotän und noch in der frühen Diakinese deutlich sichtbaren Chiasmen ist nichts mehr zu beobachten. Zwischen den parallel nebeneinander ausgestreckten Partnern klafft ein



Abb. 8

Abb. 8. Diakinese: Die Chromosomen gewinnen ihre Färbbarkeit wieder, sie kontrahieren sich und haben schließlich das Aussehen typischer später Diakinesestetraden erreicht. Etwa 2600mal



Abb. 9

Abb. 9. Frühe Metaphase. Die Tetraden ordnen sich in die Äquatorialebene ein, bevor sie das Maximum ihrer Kontraktion erreicht haben. Es wurden nicht alle Tetraden gezeichnet. Etwa 2200mal



Abb. 10

Abb. 10. Metaphase. Die Dyaden haben ihre Kontraktion beendet. Die Autosomentetraden sind parallel, das X-Chromosom senkrecht zur Spindelachse orientiert. Etwa 2200mal

Spalt, der sich verbreitert und keine Verbindung zwischen den Homologen sichtbar werden lässt. Alle Chiasmen müssen danach vollständig terminalisiert worden sein. Die Breite des Spaltes wird durch die starke Abnahme der Färbbarkeit der Chromosomen in diesem Stadium besonders betont. Möglicherweise verquillt die äußerste Hülle der Chromosomen in dieser Phase, wodurch die Homologen auseinandergedrängt werden. Jede Chromatide ist von einem ganz schwach Feulgen-positiven Hof umgeben.

Im Gegensatz zu vielen anderen Homopteren lässt sich das Verhalten der Chromosomen bei *Aphrophora salicina* auch während der Phase der starken Auflockerung verfolgen. Eine Änderung im Gesamtablauf der wesentlichen Phasen der Meiose findet dabei nicht statt. Einzelne Tetraden, die in Profilansicht liegen, erscheinen im Gegensatz zu den meisten anderen Autosomentetraden, die ihre Doppelnatürlichkeit deutlich zeigen, als einfache Stäbchen mit einer starken Einschnürung in der Mitte. Bei der XY-Tetraden scheint das Y an den Auflockerungsvorgängen unbeteiligt zu sein. Es ändert sich, soweit man das bei seiner Kleinheit feststellen

kann, weder in seiner Größe noch in seinem Aussehen. Seine Lage zum X-Chromosom bleibt die gleiche. Das X dagegen streckt sich, aber nicht in dem gleichen Ausmaß wie die anderen Chromosomen. Der Äquationsspalt wird bei günstiger Orientierung sichtbar.

Nach diesem starken Auflockerungsstadium verdichten sich die Chromosomen und werden wieder distinkter färbar. Das Verschwinden der Kernmembran und das Auftreten der Spindel ist in diesem Fall offenbar nicht streng an einen ganz bestimmten Phasenzustand der Tetraden gebunden. Die Bivalente kontrahieren sich im allgemeinen so weit, bis sie das Aussehen typischer später Diakinesetetraden erreicht haben (Abb. 8). Es kommt jedoch vor, daß die Dyaden noch relativ stark aufgelockert sind, wenn sie schon in der Äquatorialebene angeordnet sind (Abb. 9). In diesem Fall setzen sie in der Metaphase ihre Kontraktion fort, bis sie das Stadium erreicht haben wie es Abb. 10 zeigt.

III. Die Reifungsperiode

Metaphase I. Die Chromosomen der Metaphase sind nicht scharf begrenzt. Jedes Chromosom hat einen etwa ovalen Umriss und zeigt einen

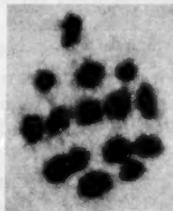


Abb. 11

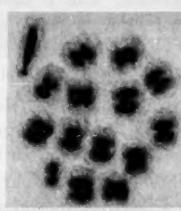


Abb. 12



Abb. 13

Abb. 11 und 12. Metaphase bei Polansicht. Jede Chromatide zeigt einen schwach Feulgen-positiven Hof. Abb. 11. Feulgen-Lichtgrün. Abb. 12 Zeichnung eines entsprechenden Stadiums. Etwa 2200mal

Abb. 13. Anaphase I. Das X-Chromosom ändert während der Anaphase seine Orientierung und wandert ungeteilt und parallel zur Spindelachse zu einem der beiden Pole. Feulgen-positive Verbindung zwischen den Enden des X-Chromosoms und den beiden entgegengesetzten Polen. Etwa 2200mal

ganz schwach Feulgen-positiven Hof (Abb. 11 und 12). Die beiden Chromatiden sind durch einen breiten Spalt getrennt (Abb. 11). Von der Seite erscheinen die Tetraden in Kantenansicht hantelförmig; in Flächenansicht sind alle 4 Chromatiden sichtbar (Abb. 10). Die lange Achse ist bei allen Autosomentetraden parallel zur Spindelachse orientiert, gegenüber den Spermatogonienchromosomen also um 90° gedreht. Eine Ausnahme stellt das XY-Bivalent dar.

Die Autosomenbivalente sind so eingeordnet, daß die Chiasmen in der ersten Reifeteilung gelöst werden. Es findet demnach Präreduktion

statt für alle homologen Chromosomenteile zwischen denen keine Chromatidenteile ausgetauscht wurden. In der Metaphase I liegt das X-Chromosom senkrecht zu der Spindelachse und damit um 90° gegenüber den Autosomenbivalenten gedreht. Das Y ist entsprechend orientiert (Abb. 10). Die Anordnung des XY-Bivalents ist also die gleiche, wie bei den Spermatogonienmitosen und bei der späteren zweiten Reifeteilung. Erst während der Anaphasebewegung ändert das X den Winkel seiner langen Achse zur Spindelachse. Das XY-Bivalent liegt stets an der Peripherie der Platte, wobei das X sogar aus der Spindel herausragen kann.

Anaphase I. Frühe Anaphasestadien findet man selten; am häufigsten sind Telophasen (Abb. 13). Zunächst sieht man die sich trennenden Homologen deutlich in die Chromatiden gespalten, jedoch nimmt die Deutlichkeit des Spaltes ab, je weiter die Anaphase fortschreitet. Durch die schlanker werdende Spindel, werden die Chromosomen dann zu geschlossenen Gruppen zusammengedrängt und sind im einzelnen nicht mehr zu identifizieren.

Das Verhalten des X-Chromosoms in der Anaphase I ist von dem der Autosomen deutlich verschieden. Die 1. Reifeteilung ist auch für das XY-Bivalent reduktionell. In der beginnenden Anaphase liegt das X zunächst noch parallel zur Äquatorialplatte; im Gegensatz zu den Autosomen und zum Y-Chromosom bleibt es in seiner Bewegung zurück und dreht sich parallel zur Achse der Spindel, bis die Anaphasebewegung abgeschlossen ist. Häufig sind Zugfasern von den Chromosomenenden nach den beiden entgegengesetzten Polen zu beobachten, ähnlich wie es SCHRADER (1935) für *Protenor belfragei* beschrieben hat. In keiner Phase macht das X den Eindruck eines irregulär oder passiv bewegten Körpers. Irgendeine Beeinflussung von seiten des Y besteht augenscheinlich nicht, denn bei *Aphrophora alni*, die kein Y-Chromosom besitzt, verhält sich das X wie bei *Aphrophora salicina*. Das Y zeigt kein ungewöhnliches Verhalten und kann wegen seiner geringen Größe in dieser Phase nur noch schwer unter den nach den Polen zu wandernden Autosomen- dyaden erkannt werden.

Metaphase II. Ein Interphasestadium wird nicht gebildet, sondern die Chromosomen gehen sehr rasch zur 2. Reifungsteilung über.

Bei *Aphrophora salicina* kommen, entsprechend der Verteilung der Chromosomen, zwei verschiedene Arten von Metaphaseplatten vor, solche mit einem X-Chromosom und andere mit einem Y (Abb. 14, 16 und 15, 17). Das X-Chromosom bzw. das Y liegen stets an der Peripherie der Metaphaseplatten. Die große Achse des X-Chromosoms ist, wie bei der 1. Reifeteilung und bei den Metaphasen in den Gonienmitosen, senkrecht zu der Spindelachse orientiert. Die gesamte polwärts gerichtete Oberfläche des Chromosoms dient als Basis für die Zugfasern. Obwohl

diese nie deutlich zu sehen sind, beweist das Verhalten des X-Chromosoms auch in diesem Fall das Vorliegen eines diffusen Spindelansatzes.

Anaphase II. Hier verhalten sich die Chromosomen wie in den Anaphasen der Spermatogonienmitosen. Das X-, oder entsprechend das

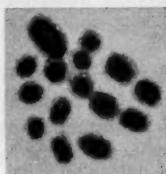


Abb. 14

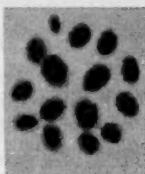


Abb. 15

Abb. 14. Metaphase II bei Polansicht mit X-Chromosom. Etwa 2200mal
 Abb. 15. Metaphase II bei Polansicht mit Y-Chromosom. Etwa 2200mal

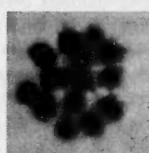


Abb. 16



Abb. 17

Abb. 16. Metaphase II mit X-Chromosom. Etwa 2200mal. Feulgen
 Abb. 17. Metaphase II mit Y-Chromosom. Etwa 2200mal. Feulgen-Lichtgrün



Abb. 18



Abb. 19



Abb. 20

Abb. 18. Anaphase II. Die Chromatiden trennen sich und behalten während ihrer Bewegung von der Äquatorialebene bis zum Pol die senkrechte Orientierung zur Spindelachse bei. Das X-Chromosom bleibt etwas in seiner Bewegung hinter den Autosomen zurück.
 Etwa 2200mal

Abb. 19 und 20. Telophase II. Das X-Chromosom wird in dieser Phase wieder positiv heteropyknotisch. Das Y-Chromosom bleibt in seiner Bewegung ebenfalls hinter den Autosomen zurück. Etwa 2200mal

Y-Chromosom, wird äqual geteilt und hinkt bei der Anaphasewanderung hinter den Autosomenchromatiden nach. Das X teilt sich seiner ganzen Länge nach, die beiden Chromatiden wandern parallel mit ihrer Breitseite den beiden Polen zu und ändern während der ganzen Anaphase-

bewegung ihre Lage zur Spindelachse nicht. Das X zeigt mit fortschreitender Anaphase seinen heterochromatischen Charakter (Abb. 19). Deutlich kann man an ihm das Hinkrümmen der Enden nach den Polen zu beobachten.

D. Diskussion

Diffuses Stadium

Bei *Aphrophora salicina* beobachtet man in der Meiose eine deutliche Tendenz zu einem diffusen Zwischenstadium während der Diakinese. Im Anschluß an die frühe Diakinese tritt die eigentümliche Auflockerung der Chromosomen ein, die eine starke Abnahme der Färbbarkeit gegenüber fuchsinschweifiger Säure und Eisenhämatoxylin zeigen. Während in anderen Fällen (SHAFFER 1920, RIS 1942, SCHRADER und LEUCHTENBERGER 1950) nach dem frühen Diplotän eine so starke Auflockerung der Dyaden einsetzt, daß sich die Chromosomen nicht mehr gegeneinander abgrenzen lassen, kann bei *Aphrophora salicina* das Verhalten der Gemini in allen Einzelheiten verfolgt werden. Bei der Aphide *Tamalia coweni* beschreibt RIS (1942), daß die gesamte Prophase durch die diffuse Natur der Chromosomen charakterisiert ist. Kein Diplotän wird analysierbar; erst in der Diakinese werden die Bivalente sichtbar. Ähnliche Verhältnisse beobachtet SHAFFER (1920) bei *Cicada septemdecim*. "Similarly in the male germ cells following the strepsitene stages, the synaptic threads appear to loose their individuality, becoming diffuse and widely expanded ('confused stage' of WILSON)." Diese in den Spermatocyten I nur kurz dauernde diffuse Phase setzt SHAFFER dem Stadium während der großen Wachstumsperiode der Oocytes homolog, denn in beiden Fällen tritt dieser diffuse Zustand nach der Konjugation ein, bevor die typischen Tetraden der späteren Diakinese erscheinen. SCHRADER und LEUCHTENBERGER (1950) beschreiben für die Pentatomide *Arvelius albopunctatus* ebenfalls ein solches diffuses Stadium im Anschluß an das Diplotän. Bei *Aphrophora salicina* durchlaufen die konjugierten Homologen im Anschluß an das Pachytän ein regelrechtes Diplotän mit deutlich sichtbaren Chromosomen und es läßt sich die Terminalisation der Chiasmen verfolgen.

Zur Frage der Matrix-Pellicula bei den Chromosomen von Aphrophora

Ein schwach Feulgen-positiver Hof umgibt in breiter Zone die Chromatiden, besonders auffällig während der Metaphase I. Die äußere Umgrenzung eines Chromosoms ist nach SCHRADER (1949) die Pellicula. Diese soll nach HIRSCHLER (1942) mit der KOPSCH-KOLATSCHEWSCHE Osmiummethode dargestellt werden können und selbst bei intensivster Chromosomenfärbung mit Eisenhämatoxylin oder der FEULGENSCHEN

Nuklealreaktion keine Spur einer Färbung zeigen. Während die Darstellung der Feulgen-positiven Matrix eindeutig gelingt, war der Nachweis einer Pellicula bei *Aphrophora* im Sinne von SCHRADER oder einer perichromosomal Membran (HIRSCHLER) nicht möglich. Eine differenzierbare Membran konnte mit der KOPSCHE-KOLATSCHESCHEN Osmiummethode niemals nachgewiesen werden.

Chromosomenbewegung

Es finden sich bei *Aphrophora salicina*, einem Homopter, und bei *Protenor belfragei*, einem Heteropter, deutliche Parallelen in dem Verhalten des X-Chromosoms bei der Reduktionsteilung. In allen Metaphaseplatten orientiert sich das X-Chromosom senkrecht zur Achse der Spindel. Die gleiche Anordnung beschreibt auch MISRA (1937) für zwei japanische *Aphrophora*-Arten. Während der Anaphase I ändert das X bei *Aphrophora salicina* den Winkel seiner langen Achse zur Achse der Spindel, es dreht sich um 90° und wandert parallel wie die Autosomen zu einem Pol. Ein ähnliches Verhalten beobachtet SCHRADER (1935) bei *Protenor belfragei*; hier wird das X-Chromosom erst in der 2. Reifeteilung reduziert; in der Anaphase II zeigt es die gleiche Orientierung und das gleiche Verhalten wie das von *Aphrophora*. Bei seinen Untersuchungen an Odonaten fand OKSALA (1943), daß das X-Chromosom sich in der Reduktionsteilung nicht einmal während der Metaphase orientiert und in der Anaphase vollkommen passiv an den einen Pol gelangt. „Alles dies spricht nachdrücklich für die Auffassung, daß die Bewegungen des Chromosoms in der Spindel stets in engem Zusammenhang mit seiner Teilungsfähigkeit stehen. Ein teilungsunfähiges Chromosom ist auch im hohen Grade unfähig sich regelmäßig ‚aktiv‘ zu bewegen.“ Für *Aphrophora salicina* und *Protenor* trifft das nicht zu. Hier zeigt das X-Chromosom immer eine ganz bestimmte Lage zur Spindelachse. Das X wird nicht passiv dem einen Pol zugeteilt, sondern unterliegt offenbar richtenden Kräften, über die sich jedoch noch nichts Sichereres aussagen läßt. Vielleicht hat dabei die Feulgen-positive Verbindung zwischen den beiden Enden des X-Chromosoms und den einander entgegengesetzten Polen einen Einfluß.

An den Chromosomen der untersuchten Hemipterenarten sind die kinetischen Funktionen über die gesamte Chromosomenlänge verteilt. In den Äquatorialplatten ordnen sich die Chromosomen im Gegensatz zu solchen mit einem lokalisierten Kinetochor unregelmäßig an. Über die Struktur des diffusen Kinetochors ist bis jetzt nichts Näheres bekannt. Eine Aneinanderreihung morphologisch sichtbarer Strukturen, die auf einen multiplen Charakter der Spindelansatzstelle schließen ließen, ist nicht vorhanden. Nach HUGHES-SCHRADER (1948) ist möglicherweise

das diffuse Kinetochor aus submikroskopischen Einheiten, die sich über das ganze Chromosom verteilen, zusammengesetzt. Beweise für diese Hypothese sind aber nicht erbracht.

Bei *Aphrophora salicina* war es nur in seltenen Fällen möglich, die direkt an der gesamten Chromosomenoberfläche angreifende Halbspindel zu beobachten. Ganz charakteristisch und einwandfrei für das Vorhandensein eines diffusen Kinetochors spricht jedoch das Verhalten der Chromosomen in den Gonienmitosen und den Reifeteilungen. Alle Autosomen und die Geschlechtschromosomen sind senkrecht zur Spindelachse angeordnet und behalten diese Orientierung auch während der Anaphasenbewegungen bei. Nur das X-Chromosom zeigt in der Anaphase I ein davon verschiedenes Verhalten. Es hat den Anschein, als ob der diffuse Spindelansatz hier nur lokal seine kinetische Funktion ausübt. Es wäre von Interesse, das Verhalten von Fragmenten des X in diesem Stadium zu untersuchen.

Zusammenfassung

1. *Aphrophora salicina* GOEZE besitzt im ♂ diploid 28 Autosomen und X und Y.
2. Vor den Reifeteilungen finden konstant 5 Gonienmitosen statt.
3. Während den Spermatogonienmitosen treten zwei verschiedene Arten von Metaphaseplatten auf. In der letzten Spermatogonienmetaphase sind die homologen Chromosomen somatisch gepaart.
4. In der Diakinese tritt ein Auflockerungsstadium ein, während dessen die Chromosomen nur ganz schwach färbbar sind. Daran anschließend findet eine Wiederverdichtung der Tetraden statt.
5. Das X-Chromosom ist in der Metaphase I senkrecht zur Spindelachse orientiert. In der Anaphase I ändert es seine Lage und wandert ungeteilt und parallel zur Spindelachse zu einem der beiden Pole.

Literatur

BORING, A. M.: A study of the spermatogenesis in the *Membracidae*, *Jassidae*, *Cercopidae*, *Fulgoridae* with especial reference to the behavior of the odd chromosome. *J. of Exper. Zool.* 4 (1907). — The chromosomes of the *Cercopidae*. *J. of Exper. Zool.* 24 (1913). — BORING, A. M., and R. H. FOGLER: Further notes on the chromosomes of the *Cercopidae*. *Biol. Bull.* 29, No 5 (1915). — HELENIUS, O.: The mode of bivalent orientation in the *Hemiptera*. *Hereditas* 38 (1952). — HIRSCHLER, J.: Osmiumschwärzung perichromosomal Membranen in den Spermatozyten der Rhynchopterart *Palomena viridissima* PODA. *Naturwiss.* 1942. — HUGHES-SCHRAEDER, S.: Cytology of Coccoids (*Coccoidea-Homoptera*). *Adv. Genet.* 2 (1948). — KORNHAUSER, S. J.: A comparative study of the chromosomes in the spermatogenesis of *Enchenopa binotata* (SAY) and *Enchenopa curvata* (FABR.). *Arch. Zellforsch.* 12, H. 2 (1914). — KUROKAWA, H.: A study of the chromosomes in some species of the *Cicadidae* and the *Cercopidae* (*Homoptera*). *J. Japan. Genet.*

Hokkaido 28 (1953). — MISRA, A. B.: A study of the chromosomes of two Japanese species of spittle-insects belonging to the family *Cercopidae* (*Homoptera*). J. Fac. Sci. Hokkaido, Ser. 6 1937. — OKSALA, T.: Zytologische Studien an Odonaten I. Chromosomenverhältnisse bei der Gattung *Aeschna* mit besonderer Berücksichtigung der postreduktionellen Teilung der Bivalente. Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A, IV. 1943. — RIS, H.: A cytological and experimental analysis of the meiotic behavior of the univalent X-chromosome in the bearberry aphid *Tamalia coweni*. J. of Exper. Zool. 90 (1942). — SCHRADER, F.: Notes on the meiotic behavior of long chromosomes. Cytologia 6 (1935). — Mitosis. New York 1949. — SCHRADER, F., and G. LEUCHTENBERGER: A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (DE GEER). Exper. Cell. Res. 1 (1950). — SHAFFER, E. L.: The germ cells of *Cicada (Tibicen) septemdecim* (*Homoptera*). Biol. Bull. 38 (1920). — STEVENS, N. M.: Studies in spermatogenesis, Part II. Carnegie Instn. Wash. Publ. 36 (1906).

Dr. GISELA ILLERT, Goddelau bei Darmstadt, Hauptstraße

Aus dem Biologischen Institut der Keiō-Universität zu Yokohama

DIFFERENTIELLE FÄRBUNG DER SOMATISCHEN
METAPHASECHROMOSOMEN VON CYPRIPEDIUM DEBILE *

I. Mitteilung

Von

NORIKO YAMASAKI

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Mai 1955)

Einleitung

Zur individuellen Unterscheidung der Chromosomen in einem Satz sind viele Untersuchungen über Form und Bau der Chromosomen an verschiedenen Organismen ausgeführt worden. Die angewandten Methoden und die Kernphasen, deren Chromosomen analysiert wurden, waren verschieden. Bei *Solanum*, *Agapanthus*, *Secale* und einigen anderen Pflanzenarten sind z. B. die Prophasechromosomen der Meiose besonders eingehend behandelt worden; ihre Individualität kann jetzt mit Sicherheit erkannt werden.

Neuerdings hat man die Verfasserin bei *Cypripedium debile* REICHENBACH festgestellt, daß die Metaphasechromosomen in den somatischen Teilungen durch die von ihr modifizierte Färbungsmethode mit Orcein-essigsäure eine sehr deutliche, differentielle Färbung zeigen. Es ließen sich an den blaßgefärbten Metaphasechromosomen betreffs der Breite und Lage konstante, tief gefärbte Teile deutlich machen, die in der vorliegenden Arbeit „Querstreifen“ genannt sind. Diese Färbungsdifferenzierung der Metaphasechromosomen ist bis jetzt kaum beachtet worden, ist aber recht auffällig. Die Verfasserin berichtet im folgenden vorläufig über ihre Versuche, welche sich hauptsächlich auf die Darstellung der Querstreifen nach verschiedenen Färbungs- und Fixierungsmethoden, sowie Vorbehandlungen beziehen.

Befunde

1. Fixierung und Färbung mit Essigorcein

a) Ohne Vorbehandlung. Wurzelspitzen von 6—8 mm Länge wurden auf einem Objektträger in 4 Teile zerlegt und für 15 min in ein Gemisch von 9 Teilen 0,25%iger Orceinlösung¹ in 45%iger Essigsäure und 1 Teil nHCl gebracht, das im Wasserbad bei 60° C gehalten wurde. Diese

* Contributions from the Biological Institute, Keiō University, No. 9.

¹ Der von der Firma Wakō, Pharmazeutische Werke, hergestellte Farbstoff wurde verwendet.

Temperatur mußte möglichst genau eingehalten werden, sonst ließen sich die Querstreifen nicht in klarer Form darstellen¹. Nach dem Aufenthalt in der warmen Farblösung wurden die zerlegten Wurzelspitzen auf einen Objektträger in kalte Orceinessigsäurelösung gebracht, mit einem Deckglas bedeckt und durch kräftigen Daumendruck nach Auflegen von einigen Blatt Filtrierpapier zum Quetschpräparat verarbeitet. Dieses wurde mit einem beliebigen Einschlußmittel umrandet. Bei den in dieser Weise angefertigten Präparaten färbten sich die Chromosomen deutlich differentiell (Abb. 1), während sie sich bei mit der gewöhnlichen Methode angefertigten Dauer- oder Quetschpräparaten gleichmäßig färbten (MIDUNO, unveröffentlicht). Ungefähr in der 3. Woche nach der Präparierung färbten sich die Querstreifen der Chromosomen am stärksten und zeigten einen deutlichen Kontrast gegen andere Teile der Chromosomen, welche sich mit der Zeit entfärbten. Alle 20 Chromosomen von *Cypripedium debile* zeigen jedes für sich breite oder schmale Querstreifen. Wenn der Ausbildungsgrad der Querstreifen, wie die Abbildungen zeigen, auch in den einzelnen Zellen mehr oder weniger verschieden sein kann, so waren doch Zahl, Breite und Orte der Querstreifen für jedes bestimmte Chromosom konstant. Nach der genauen Karyotypanalyse hinsichtlich der Querstreifen hat MIDUNO (unveröffentlicht) bestätigt, daß ungeachtet der einander sehr ähnlichen, V-förmigen Chromosomen des Satzes die Querstreifen jedes Chromosoms die Individualität der Chromosomen anzeigen und daß in bezug auf die Ausbildung der Querstreifen je 2 ganz gleiche Typen der Chromosomen im diploiden Bestand vorhanden sind. Es lassen sich also die homologen Chromosomen leicht erkennen.

b) Vorbehandlung mit der 8-Oxychinolinwasserlösung. Die abgeschnittenen Wurzeln wurden für 3–6 Std in eine 0,003 molare Lösung gebracht (TJIO und LEVAN 1950). Gleich nach Beendigung der Vorbehandlung erfolgten Fixierung und Färbung. 8-Oxychinolin hatte keinen Einfluß auf die Ausbildung der Querstreifen; die Karyotypanalyse anhand der Querstreifen war dadurch eher erleichtert, daß die Chromosomen wegen der spindelzerstörenden Wirkung des 8-Oxychinolins einzeln und in der Zelle nicht übereinander gelagert waren (Abb. 2), wie das sonst ohne Vorbehandlung der Fall ist.

c) Kältebehandlung. Die Ausprägung der Querstreifen der Metaphasechromosomen in den somatischen Teilungen ist dem Effekt, der an anderem Material durch Abkühlung von bestimmter Dauer vor der

¹ Nach den weiteren Untersuchungen ist es klar geworden, daß die geeignete Temperatur je nach den Pflanzenarten verschieden ist. Vielleicht beruht das darauf, daß je nach der Pflanzenart die Empfindlichkeit der Matrix gegenüber der Temperatur oder den benutzten Mitteln sich unterscheidet. Hierüber soll später berichtet werden.

Fixierung erzielt wurde, ähnlich (DARLINGTON und LA COUR 1938, 1940, KURABAYASHI 1953). Um beide Erscheinungen zu vergleichen, wurden

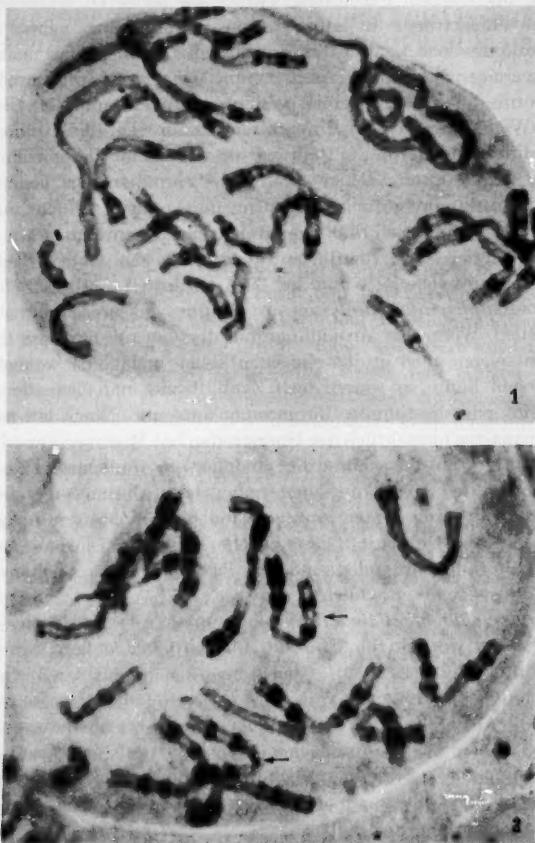


Abb. 1. Orcein-sulfuric acid-saltsulfuric acid-Färbung ohne Vorbehandlung. Vergr. 1215mal
 Abb. 2. Vorbehandlung mit 8-Oxychtnolin. Die Pfeile bezeichnen ein an den Querstreifen erkennbares homologes Chromosomenpaar. Der Kern ist durch den Druck auf den Objektträger beschädigt worden; einige Chromosomen sind infolgedessen zerbrochen oder aus dem Kern herausgepreßt worden. Vergr. 1215mal

Abkühlungsversuche vorgenommen. Nach einem Aufenthalt von 48 Std bei 1—3° C der bewurzelten *Cypripedium*-Pflanzen wurden die Wurzelspitzen in der obenerwähnten Weise fixiert und gefärbt. Die Chromo-

somen zeigten die Querstreifen so wie ohne Vorbehandlung. Die Kälte hat also keinen besonderen Einfluß auf das Auftreten der Querstreifen (Abb. 3).

d) *Vorbehandlung mit 0,25%iger wässriger Colchicinlösung.* Nach einer 3stündigen Vorbehandlung mit dieser Lösung färbten sich die Chromosomen in der Orceinlösung gleichmäßig an, die differentielle Färbung kam nicht zum Vorschein (Abb. 4). Näheres über Versuche mit varierter Konzentration und Einwirkungsdauer der Colchicinlösung soll später berichtet werden.

e) *Vorbehandlung mit Ammoniakwasser.* Bisher wurde Ammoniakwasser für die Despiralierung der Chromosomen, besonders in der Reduktionsteilung benutzt (KUWADA, SHINKE, und OURA 1938). Im vorliegenden Versuch wurden die abgeschnittenen Wurzelspitzen für 5–15 min in eine $1/100$ molare Lösung gebracht. Diese Konzentration ist für die Despiralierung der Chromosomen angegeben worden. Sie bewirkte auch bei *Cypripedium* eine Despiralierung, wodurch die Chromosomen schlanker wurden. Die Chromonemaspiralen der somatischen Chromosomen wurden sichtbar, während sich die Querstreifen der Chromosomen nicht darstellen ließen. Die Chromosomen färbten sich homogen, soweit nicht der Spiralbau wahrnehmbar war (Abb. 5).

Die Ergebnisse der Vorbehandlung auf die Darstellung der Chromosomenquerstreifen lassen sich folgendermaßen tabulieren:

Vorbehandlung	Querstreifen
Abkühlung	+
8-Oxychinolin	+
Colchicin	—
Ammoniakwasser	—

2. Versuche über den Einfluß der Fixierung

Die Versuche wurden hauptsächlich mit dem Nawaschinschen Fixierungsgemisch und seinen Komponenten, besonders der Essigsäure vorgenommen. In jedem Versuch wurden die Wurzelspitzen nach der 15–25 min dauernden Fixierung 10 min lang gewaschen, in 4 Stücke



Abb. 3. Kältevorbehandlung. Vergr. 1215mal

zerlegt und in die n HCl-haltige Orceinessigsäurelösung gebracht. Anschließend wurde wie oben verfahren.

a) Fixierung mit dem NAWASCHINSchen Gemisch ergab keine Querstreifen. Um zu prüfen, ob die Salzsäure, die einen Bestandteil der

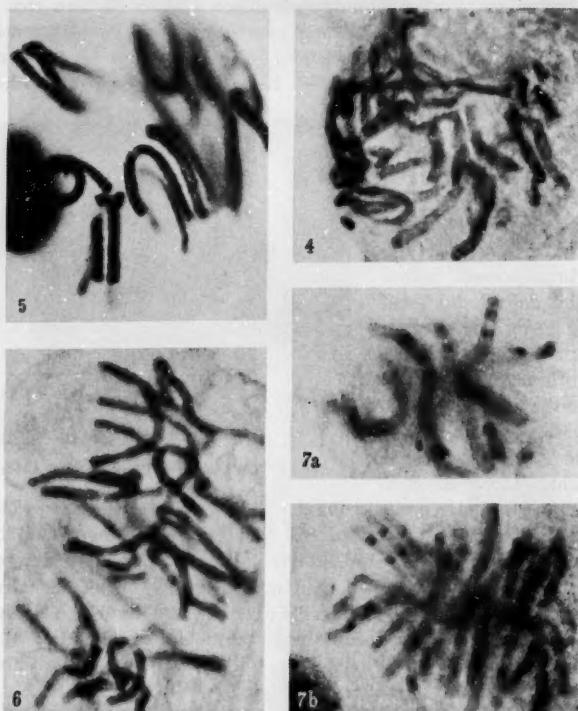


Abb. 4. Vorbehandlung mit Colchicin. Vergr. 1215mal. — Abb. 5. Vorbehandlung mit Ammoniumwasser. Vergr. 1215mal. — Abb. 6. Fixierung mit Chromessigsäure. Vergr. 1215mal. — Abb. 7a. Vorbehandlung mit 8-Oxychinolin und Färbung nach Feulgen. Vergr. 1215mal. — Abb. 7b. Färbung nach Feulgen ohne Vorbehandlung. Vergr. 1215mal

Orceinlösung, nicht aber des Nawaschinschen Gemisches bildet, mit der Darstellung der Querstreifen zu tun hat, wurde auch ein Gemisch aus 1 Teil n HCl und 9 Teilen Nawaschin geprüft. Auch nach seiner Anwendung ließen sich die Querstreifen nicht beobachten.

b) Nach Fixierung mit 10%iger oder 45%iger Essigsäure sowie mit einem Gemisch aus 9 Teilen 45%iger Essigsäure und 1 Teil n HCl traten die Querstreifen deutlich hervor.

c) Die eine Stammlösung aus 1 g Chromsäure, 10 cm³ Essigsäure und 90 cm³ Wasser fixierte das Material, ohne die Querstreifen sichtbar zu machen (Abb. 6).

d) Die andere Stammlösung aus 80 cm³ 40%igem Formol und 10 cm³ Wasser brachte ebenfalls keine Querstreifen hervor.

3. Die Färbung mittels der Feulgenschen Nuklearfärbung

Außer dem Fixierungsmittel wurde die Methode KURABAYASHIS (1953) angewandt. Bei dem Material, das mit Nawaschinschem Gemisch fixiert wurde, färbten sich die Chromosomen nicht differenziert, sondern homogen.

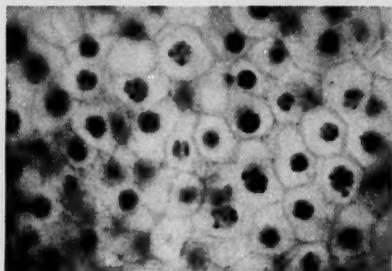


Abb. 8
Abb. 8. Wurzelquerschnitt. Vergr. 90mal

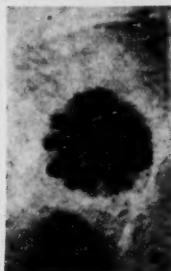


Abb. 9
Abb. 9. Ruhekern mit auffälligen Chromozentren. Vergr. 720mal. Gentianaviolettfärbung

Weiter fixierte ich Material mit einem Gemisch aus 9 Teilen 45%iger Essigsäure und 1 Teil n HCl. Die Wurzeln waren vor der Fixierung in 4 Teile zerlegt; während der 15 min langen Fixierung wurde die Temperatur der Fixierungslösung bei 60° C gehalten. Nach 15 min Waschen verblieben die Wurzelspitzen 40–60 min lang in der fuchsin schwefeligen Säure. Danach wurden sie in 1 Tropfen 45%iger Essigsäure auf den Objektträger gebracht und unter dem Deckglas so stark zerdrückt, bis das meristematische Gewebe der Wurzelspitzen in eine einzellige Schicht auseinandergepreßt wurde. In solchen Präparaten färbten sich die Chromosomen deutlich differenziell (Abb. 7 b). Auch bei dem mit 8-Oxychinolinlösung vorbehandelten Material zeigten die Chromosomen ihre färberische Differenzierung (Abb. 7 a). Nach einiger Zeit kamen die Querstreifen der Chromosomen deutlich zum Vorschein, und ungefähr 2 Monate nach der Präparation sind sie für die Beobachtung am besten geeignet.

Um die Reaktionen der Querstreifendifferenzierungen auf die verschiedenartigen Vorbehandlungen und Fixierungsmittel genauer zu bestimmen, sind jetzt umfangreiche Versuche im Gange, deren Ergebnisse binnen kurzem veröffentlicht werden. Der Versuch wird in starker Anlehnung an die Abkühlungsverfahren von DARLINGTON und LA COUR (1938) durchgeführt, um damit die Beziehung zwischen der von ihnen erstmalig bewiesenen Tatsache der „differential reactivity of chromosomes“ und den hier beschriebenen Chromosomenquerstreifen zu klären.

Bis jetzt konnte die Verfasserin durch die vorliegende Methode auch bei den Chromosomen von *Fritillaria*, *Trillium* und einigen anderen Pflanzenarten die differentielle Färbung hervorbringen. Der Ausprägungszustand dieser Querstreifen ist dem von DARLINGTON und LA COUR beschriebenen ähnlich. Ein Bericht darüber soll dem vorliegenden folgen.

Hier sei noch erwähnt, daß *Cypripedium debile* in den Ruhekernen zahlreiche, außerordentlich große Chromozentren besitzt (Abb. 8 und 9) und daß die eigentümlichen Querstreifen der Chromosomen höchstwahrscheinlich als Heterochromatin anzusehen sind.

Zusammenfassung

Durch die von der Verfasserin entwickelte Methode der gleichzeitigen Fixierung und Färbung mit einem Gemisch von Orceinessigsäure und Salzsäure kann man bei *Cypripedium debile* eine eigentümliche Färbungsdifferenzierung der Metaphasechromosomen in somatischen Mitosen erzielen, die im Auftreten von hinsichtlich des Ortes und der Breite konstanten, tief gefärbten „Querstreifen“ der Chromosomen besteht.

Für die Prüfung dieser Reaktionserscheinung gegen die Vorbehandlungen und Fixierungsmittel wurden einige Versuche durchgeführt.

Nach Abkühlung und nach Vorbehandlung mit 8-Oxchinolin färbten sich die Chromosomen differentiell wie ohne Vorbehandlung, während sie nach Ammoniak- und Colchicinvorbehandlung homogen gefärbt waren.

Nach Nawaschin-Fixierung treten die Chromosomenquerstreifen nicht hervor, unabhängig davon, ob man die Salzsäure im gleichen Mengenverhältnis wie bei Orceinessigsäurelösung zusetzt oder nicht. Die Salzsäure hat also wahrscheinlich keinen Einfluß.

Unter den Bestandteilen des Nawaschinschen Gemisches scheint Essigsäure die Darstellung der Chromosomenquerstreifen zu fördern, während Chromsäure und Formol sie hemmen.

Zum Schluß sei mir gestattet, meinem Lehrer, Herrn Prof. T. MIDUNO für die liebenswürdige Anregung zu diesen Versuchen und für seine Ratschläge und Herrn Dr. B. SAKAI von der Metropolitanuniversität, der mich in die Technik der Orceinfärbung freundlichst einleitete, an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen; auch habe ich von Herrn Y. MORI von der hiesigen Universität bei der Abfassung des Manuskriptes dankenswerte Hilfe erfahren.

Literatur

DARLINGTON, C. D., and L. LA COUR: Differential reactivity of the chromosomes. Ann. of Bot., N. S. 2, 615—626 (1938). — Nucleic acid starvation in chromosomes of *Trillium*. Genetics 40, 185—213 (1940). — KURABAYASHI, M.: Differential reactivity of chromosomes in *Trillium*. J. Fac. Sci. Hokkaido, Ser. V, 6, 233—247 (1935). — KUWADA, Y., N. SHINKE u. G. OURAS: Artificial uncoiling of the chromonema spirals as a method of investigation of chromosome structure. Z. wiss. Mikrosk. 55, 8—16 (1938). — TJO, H., and A. LEVAN: The use of oxyquinoline in chromosome analysis. Anal. Estacion exper. Aula Dei 2, 21—64 (1950).

Fräulein Dr. N. YAMASAKI, Biologisches Institut,
Keio Universität,
Yokohama-Hiyoshi, Japan

